

**Identifizierung und weitergehende  
phäno- und genotypische Charakterisierung  
von *Staphylococcus aureus*, isoliert von  
Schafen und Ziegen**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

**Michaela Rosenboom**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

ISBN 3-89687-669-4

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2004

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde,  
Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Ch. Lämmeler, Prof. Dr. E. Usleber

**Identifizierung und weitergehende phäno- und genotypische  
Charakterisierung von *Staphylococcus aureus*, isoliert von  
Schafen und Ziegen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Michaela A. Rosenboom**  
Tierärztin aus Aachen

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Lämmle

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Usleber

Tag der mündlichen Prüfung: 02. März 2004

*Meinen Eltern*

	Seite
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht</b>	<b>2</b>
2.1 <i>S. aureus</i> : Taxonomische Einordnung und einige Eigenschaften	2
2.1.1 <i>S. aureus</i> als Mastitiserreger bei Schafen	2
2.1.2 <i>S. aureus</i> als Mastitiserreger bei Ziegen	4
2.1.3 Vorkommen von <i>S. aureus</i> bei weiteren Erkrankungen von Schafen und Ziegen	5
2.2 Mutmaßliche Pathogenitätsfaktoren von <i>S. aureus</i>	8
2.2.1 Hämolysine	10
2.2.2 Wechselwirkungen von <i>S. aureus</i> mit Fibrinogen	11
2.2.3 Protein A	14
2.2.4 Thernonuklease und Hyaluronidase	15
2.2.5 Enterotoxine	16
2.2.6 “Toxic Shock Syndrom Toxin” (TSST)	21
2.2.7 Exfoliative Toxine	23
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>25</b>
3.1 Materialien	25
3.1.1 Chemikalien, Biochemika und Verbrauchsmaterial	25
3.1.2 Lösungen und Puffer	25
3.1.3 Bakterienkulturen	26
3.1.3.1 Isolate vom Schaf	26
3.1.3.2 Isolate von der Ziege	26
3.1.3.3 Sonstige verwendete Bakterienkulturen	27
3.1.4 Nährmedien und Zusätze	27
3.1.5 dNTP und Oligonukleotidprimer	28
3.1.6 Enzyme	29
3.1.7 Marker	29
3.1.8 Kits	29
3.1.9 Antibiotikatestblättchen	30
3.1.10 Geräte	30
3.2 Methoden	31

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.1	Anzüchtungsmedien	31
3.2.2	Hämolysenformen	33
3.2.3	Pigmentbildung	34
3.2.4	Nachweis der Koagulasereaktion	34
3.2.5	Nachweis des Clumping-Faktors	34
3.2.6	Identifizierung mit Hilfe des „Staphaurex-Plus Testsystems“	35
3.2.7	Weitere Enzymnachweise	35
3.2.7.1	DNase und Thernonuklease	35
3.2.7.2	Hyaluronidase	37
3.2.8	Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten	37
3.3	Nachweis von <i>S. aureus</i> -spezifischen Genabschnitten und Toxingenen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
3.3.1	DNA-Präparation mit dem „Quiagen Tissue Kit“	39
3.3.2	Durchführung der PCR	40
3.3.3	Oligonukleotidprimer und Thermocycler-Temperaturprogramme	40
3.3.4	Agarosegelelektrophorese	43
3.3.5	Ethidiumbromidfärbung	43
3.4	Nachweis der Staphylokokkenenterotoxine A, B, C, D und E	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	45
4.1	Phänotypische Eigenschaften	45
4.2	Nachweis von speziesspezifischen Genabschnitten	48
4.3	Nachweis von Enterotoxinen bzw. Toxingenen	57
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	61
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	79
<b>7</b>	<b>Summary</b>	81
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	82
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	103

## 1 Einleitung

Infektionen, die durch Bakterien der Gattung *Staphylococcus* hervorgerufen werden, sind durch meist eitrige Krankheitsprozesse charakterisiert. Durch die ubiquitäre Verbreitung dieser Bakterien, die sowohl die gesunde Haut als auch Schleimhaut besiedeln können, ergeben sich zahlreiche Ansteckungsmöglichkeiten. Die größte Bedeutung unter den bislang in der Gendatenbank der NCBI (National Center for Biotechnology Information, unter der Webadresse: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), Stand: 09/2002) beschriebenen 49 Staphylokokkenspezies und Subspezies besitzt *Staphylococcus* (*S.*) *aureus*, welcher neben lokalisierten und generalisierten pyogenen Erkrankungen auch toxinvermittelte Krankheitsprozesse hervorrufen kann. Bei Milchkühen ist *S. aureus* ein häufiger Verursacher von Mastitiden und stellt somit, insbesondere durch den häufig subklinischen Verlauf dieser Mastitiden, ein bedeutendes wirtschaftliches Problem dar. Neben Veränderungen in der Zusammensetzung der Milch kann es zu Leistungsrückgang bis hin zum vollständigen Funktionsverlust der betroffenen Milchdrüse kommen. (BRÜCKLER et al., 1994; TRÁVNÍČEK und FEDERIČ, 1994; LAUDE, 2000).

Bei Schafen und Ziegen ruft *S. aureus* in der Regel eine akute, katarrhalische Mastitis hervor, die häufig dramatisch verlaufen kann (TRÁVNÍČEK und FEDERIČ, 1994; WENDT et al., 1994). Über Ursachen für den schwerwiegenden Verlauf dieser Mastitiden und über die Eigenschaften insbesondere das Toxinbildungsvermögen der hierfür verantwortlichen *S. aureus*, ist bisher noch wenig bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher zunächst die Identifizierung von *S. aureus*, isoliert aus Milchproben sowie von Haut- und Schleimhautproben von Schafen und Ziegen, mittels konventioneller und molekularer Untersuchungsverfahren. Letzteres erfolgte durch den Nachweis speziesspezifischer Gene bzw. Genabschnitte. Im weiteren wurden durch PCR-vermittelte Analysen das Toxinbildungsvermögen der Kulturen bzw. deren Toxingene untersucht.



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 *S. aureus*: Taxonomische Einordnung und einige Eigenschaften

*S. aureus* wird der Gattung *Staphylococcus* und der Familie *Micrococcaceae* zugeordnet. Bei Staphylokokken handelt es sich um grampositive, unbewegliche und fakultativ anaerobe Kokken mit einem Durchmesser von 0,5-1,5 µm. Sie bilden keine Sporen und ordnen sich in unregelmäßigen, traubenförmigen Haufen an. Staphylokokken stellen kaum kulturelle Ansprüche und wachsen auf fast allen Nährböden. Der Name *S. aureus* leitet sich von der oft goldfarbenen Pigmentierung der Kolonien ab, Pigmentierungen von grauweiß, weiß über gelb bis gelborange kommen ebenfalls vor (KLOOS und SCHLEIFER, 1986; BRÜCKLER et al., 1994; BOERLIN und NICOLET, 2002). Neben *S. aureus* werden in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Webadresse: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) sowie in der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (DSMZ, Webadresse: [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)) bislang 49 Staphylokokkenspezies und Subspezies geführt (Stand: 08/2002), deren Differenzierung anhand struktureller Merkmale der Zellwand sowie physiologischer, biochemischer und molekularer Eigenschaften erfolgte (BOERLIN und NICOLET, 2002).

#### 2.1.1 *S. aureus* als Mastitiserreger bei Schafen

Die Staphylokokkenmastitis tritt bei Schafen weltweit auf und zählt laut BOCKLISCH und WETZSTEIN (1994) zu den verlustreichsten Mutterschafkrankheiten. Sie wird hauptsächlich durch *S. aureus*, seltener durch *Staphylococcus epidermidis* oder andere Staphylokokken hervorgerufen. BOCKLISCH und WORBES (1993) untersuchten Milchproben von 849 an Mastitis erkrankten Schafen und konnten bei 20 % der Isolate *S. aureus* nachweisen. LAFI et al. (1998) untersuchten 3472 Proben von klinischen und subklinischen Mastitiden bei Awassi-Schafen in Nord-Jordanien und isolierten bei der Mehrzahl der klinischen Mastitiden (22 %) *S. aureus*. Bei der subklinischen Mastitiden der Awassi-Schafe kam *S. aureus* mit 6,8 % am dritthäufigsten vor.

Bei der Staphylokokkenmastitis erkranken 10-30 % der Muttertiere in der ersten Laktationsperiode drei bis sieben Wochen nach dem Ablammen. Der Erreger wird durch saugende Lämmer oder infolge von Hygienemängeln während des Melkvorganges übertragen und kann so über den Zitzenkanal in das Euter eindringen (ROLLE und MAYR, 1993; BRÜCKLER et al., 1994; TRÁVNÍČEK und FEDERIČ, 1994). Die Infektion verläuft in der Regel akut und führt nach ein bis zwei Tagen zu einer Gangrän sowie zu einer Nekrose des Milchdrüsengewebes. Klinisch auffällige Symptome, wie Zurückbleiben in der Herde, verminderte Futteraufnahme, Hinken sowie das Abstoßen der Lämmer, treten nach 24 h auf. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kann die Körpertemperatur bis über 40 °C ansteigen, es können Tachykardien und Störungen der Atemfunktion auftreten. Die betroffene Euterhälfte ist vergrößert, verhärtet, warm und schmerzhaft. Ihre Farbe ändert sich über violett bis hin zum sogenannten „schwarzen Euter“. Das Milchsekret wird dünn-wässrig, rötlich-eitrig und ist mit Flocken durchsetzt (PALLASKE, 1960; TONTIS, 1974; ROLLE und MAYR, 1993; BOCKLISCH und WETZSTEIN, 1994; TRÁVNÍČEK und FEDERIČ, 1994; DAHME und WEISS, 1999). Mit zunehmender Dauer der Erkrankung, laut BOCKLISCH und WETZSTEIN (1994) insbesondere ab dem dritten Krankheitstag, wird es serumartig, lachsfarben bis schwarzrot und entwickelt einen fauligen Geruch (Brandjauche). Ist das Eutergewebe jedoch gleichzeitig mit Fäulnisbakterien infiziert, kommt es zur feuchten Nekrose und die Tiere sterben innerhalb weniger Stunden oder Tage. Diese nekrotisierende Mastitis tritt häufig seuchenartig innerhalb einer Herde auf (PALLASKE, 1960; TONTIS, 1974; TRÁVNÍČEK und FEDERIČ, 1994; DAHME und WEISS, 1999). Die Prognose für die erkrankten Tiere ist bei der akuten, nekrotisierenden Mastitis ungünstig. Laut BRÜCKLER et al. (1994) ist die Prognose nur dann günstig, wenn die Behandlung innerhalb der ersten 24 h eingeleitet wird, da in der Regel nahezu 90 % der erkrankten Tiere nach zwei bis drei Tagen infolge einer Pyämie sterben. Geht die akute Mastitis in ein chronisches Stadium über wird das Sekret eitrig, es kann zu Abszedierungen und zur Induration des inter- und intralobulären Bindegewebes der Milchdrüse kommen. Da besonders in den oberen Drüsenabschnitten oft noch laktierende Bereiche vorhanden sind, kann es infolge von Sekretstauungen zu Zystenbildungen kommen (DAHME und WEISS, 1999). Die chronische Form der Mastitis ist meist nicht tödlich, die Tiere werden jedoch in der nächsten Laktationsphase zur Infektionsquelle für andere Tiere und scheiden die

Staphylokokken unter Umständen noch Monate lang mit der Milch aus (ROLLE und MAYR, 1993; BRÜCKLER et al., 1994; TRÁVNÍČEK und FEDERIČ, 1994).

BOCKLISCH und WETZSTEIN untersuchten 1994 insgesamt 6500 Mutterschafe während der ersten zwei Ablammungsperioden und entdeckten in dieser Zeit 467 an Mastitis erkrankte Muttertiere. Bei 84 % der untersuchten Mastitismilchproben konnten spezifische pathogene Bakterien festgestellt werden, bei denen es sich vor allem um *Pasteurella haemolytica* und *S. aureus* handelte. Auch diese Autoren stellten fest, dass für eine günstige Prognose die möglichst frühzeitige Kombinationstherapie aus der parenteralen und intrazisternalen Verabreichung von Antibiotika von Bedeutung ist. BOERLIN und NICOLET (2002) schlugen als besten Therapiezeitpunkt die Zeit während des Trockenstehens vor. Gut bewährt haben sich nach diesen Autoren  $\beta$ -Lactamantibiotika (Penicillin, Cloxacillin) oder Makrolidantibiotika (Spiramycin, Erythromycin). Alternativ kann eine Therapie mit Aminoglycosiden (Neomycin, Gentamicin) eingeleitet werden. Da in Europa ca. die Hälfte aller isolierten *S. aureus*-Stämme Penicillinase-Bildner sind, sollten, wenn möglich, penicillinasestabile Antibiotika (Cloxacillin) oder Kombinationspräparate (Penicillin, Aminoglycosidantibiotika) angewendet werden. Weiterhin sollte man den Maßnahmen zur Prophylaxe, hierzu zählt die Einhaltung der Melkreihenfolge nach dem Infektionsstatus der Tiere, sowie die regelmäßige Überwachung der Eutergesundheit, eine große Bedeutung zukommen lassen. Eine Immunprophylaxe, d.h. eine aktive Immunisierung mit einem Toxoid-Impfstoff hat sich nach Untersuchungen von BOERLIN und NICOLET (2002) bislang nicht bewährt.

### 2.1.2 *S. aureus* als Mastitiserreger bei Ziegen

*S. aureus* ruft bei der Ziege überwiegend eine nekrotisierende Mastitis hervor, während für subklinische Mastitiden meist *S. epidermidis* verantwortlich zu sein scheint. WHITE und HINCKLEY (1999) beobachteten acht Jahre lang den Hygienestatus von 2911 Euterhälften von Ziegen im Rahmen von Routineuntersuchungen in den USA und konnten in 11 % der untersuchten Proben *S. aureus* nachweisen. Nach diesen Autoren handelt es sich bei *S. aureus*, isoliert von Ziegen, um den am zweithäufigsten nachgewiesenen, jedoch pathogensten Mikroorganismus.

WINTER und BAUMGARTNER prüften 1999 in Österreich Milchproben von 65 Ziegen. Dabei erwiesen sich 55 dieser Proben als bakteriologisch positiv. Bei 85,5 % der untersuchten Erreger handelte es sich um Staphylokokken, davon bei 51,5 % um *S. aureus*.

Die Infektion erfolgt, wie bereits unter 2.1.1 für die Staphylokokkenmastitis der Schafe beschrieben, über den Zitzenkanal bzw. lymphohämatogen nach Verletzungen der Euterhaut. Die *S. aureus*-Mastitis der Ziegen zeigt sich, wie oben erwähnt, oft als schwere, nekrotisierende Entzündung oder in Form einer katarrhalischen Mastitis. Das klinische Bild ähnelt dem des Schafes und zeichnet sich durch starke Allgemeinstörungen, einem geschwollenen Euter sowie stark verändertem, faulig riechendem Sekret aus. Infolge von Septikämie verenden die Tiere häufig bereits nach 24 h. Die primär katarrhalische Form dagegen kann innerhalb einer Woche in eine chronisch-abzedierende Mastitis übergehen (TRÁVNÍČEK und FEDERIČ, 1994). Überleben die Tiere, so werden die nekrotischen Bereiche abgekapselt, und es kommt zur Sequesterbildung bis hin zur Abstoßung ganzer Mammarkomplexe (DAHME und WEISS, 1999). Wie bereits für das Schaf beschrieben, ist ebenfalls bei der Ziege die Prognose für eine Wiederherstellung der Drüsenfunktion des Euters ungünstig; wichtig ist eine möglichst frühzeitige Kombinationstherapie mit intrazisternal und parenteral verabreichten Antibiotika (BRÜCKLER et al., 1994; TRÁVNÍČEK und FEDERIČ, 1994).

### **2.1.3 Vorkommen von *S. aureus* bei weiteren Erkrankungen von Schafen und Ziegen**

Über Verletzungen bzw. Schädigungen der Haut ist es Staphylokokken möglich in die Haut einzudringen und pyogene Infektionen und Entzündungen (Pyodermien) hervorzurufen. Beim Schaf führt eine Infektion mit *S. aureus*, besonders an schwach behaarten Körperpartien, zu follikulären, pustulösen oder ulzerierenden Dermatiden und je nach Lokalisation, Ausbreitung und Verlauf der Infektion kommt es zur Bildung von Impetigo, Ekthyma, Akne, Furunkulose bis hin zu Abszessen oder Phlegmonen (WEISS, 1990; BOSTEDT und DEDIÉ, 1996).

MOLLER et al. (2000) berichteten bei Schafen in Dänemark über das Auftreten von Abszessen und käsigem Lymphadenitiden. Bei vier bis fünf Monate alten importierten Lämmern konnten zehn Tage nach ihrer Ankunft in Dänemark, besonders an Kopf, Nacken, Schulter, nahe der regionalen Lymphknoten, subkutane Abszesse beobachtet werden. Diese Abszesse enthielten eine visköse, weiß-gelbe, geruchlose Masse, aus der sich der Erreger *S. aureus* ssp. *anaerobius* anzüchten ließ. Bei vier der untersuchten Tiere kamen diese Abszesse im Zusammenhang mit einer pulmonalen Adenomatose vor.

Die schlimmste Form der durch *S. aureus* hervorgerufenen Hautinfektionen von Schafen und Ziegen stellt die Staphylokokken-Dermatitis (Staphylokokken-Pyodermie) dar. Es können zwei verschiedene, unabhängig voneinander auftretende Formen der Dermatitis beobachtet werden. Hierbei handelt es sich um die hauptsächlich im Augenbereich vorkommende Kopfform und die sogenannte Beinform, die in der Regel distal der Karpal- und Tarsalgelenke lokalisiert ist (SYNGE et al., 1985; BEHRENS, 1987; TRÁVNIČEK und FEDERIČ, 1994; BEHRENS et al., 2001). DAHME und WEISS (1999) beschrieben eine durch *S. aureus* hervorgerufene eitrig-nekrotisierende Dermatitis des Schafes, die vor allem an Augen, Hornansatz und Oberkiefer auftritt und fälschlicherweise als periorbitales oder faciales Exem beschrieben wird. Laut TRÁVNIČEK und FEDERIČ (1994) geht einer *S. aureus*-Dermatitis in der Regel eine Schädigung der Haut durch äußere Einflüsse wie z.B. Sonneneinstrahlung, Befall durch Hautparasiten, Schädigung durch hautpathogene Viren oder infolge des Infektionsdruckes durch verschmutzte Stallungen oder Bäder voraus. Weiterhin können innere Einflüsse wie Lichtempfindlichkeit, allergische Ekzeme, Ernährungsfehler (z.B. Zinkmangel), Immunsuppression gegen Ende der Trächtigkeit, sowie Mykotoxine oder Infektionskrankheiten die Haut vorschädigen. Dies erleichtert eine Sekundärinfektion mit *S. aureus*. Besonders anfällig für Staphylokokken-Pyodermien sind Sauglämmer in dem Zeitraum vom Abklingen der Kolostrallimmunität bis zum Aufbau der eigenen Immunabwehr nach fünf bis sieben Wochen. Bei Lämmern treten die follikulären bis pustulösen Dermatiden meist im Bereich von Mund und Perinäum auf, bei Mutterschafen auf der Haut des Euters, der Vulva und des Perinäums. Bei letzteren verlaufen sie in der Regel gutartig, mit Ausnahme von hochträchtigen Mutterschafen, bei denen Ulzerationen auftreten können. Die Infektion der Sauglämmer erfolgt meist hämatogen über Nabelinfektionen, Euterentzündungen oder Entzündungen der

Euterhaut und entwickelt sich entweder akut-septikämisch oder subakut bis chronisch. Oft sind innere Abszesse oder Arthritiden die Folge (BOSTEDT und DEDIÉ, 1996).

Bei Ziegen verlaufen die Staphylokokken-Pyodermien oft schwer und stellen somit ein besonderes Problem dar. Die Entzündung beginnt am Kopf (Lippe oder Mund) oder am Euter bzw. in der Kniefalte. Zunächst bilden sich Schuppen und Knötchen ohne Juckreiz die sich auf den Nacken und Rücken ausbreiten und zu tiefergehenden Abszessen werden. Diese mit Detritus behafteten Granulationsgewebe bluten leicht, sind von dunklem Schorf bedeckt und von einer haarlosen Zone umgeben. Die Abheilung erfolgt von der Peripherie aus. Der hiermit verbundene Haar- bzw. Wollausfall führt zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten.

Als Ursache einer solchen Staphylokokken-Dermatitis von Schafen und Ziegen gilt die Infektion der bis über das Stratum corneum hinausgehend vorgeschädigten Haut mit dermopathogenen *S. aureus*-Stämmen, die in der Lage sind,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\delta$ -Hämolysine zu bilden. Therapeutisch ist bei Schafen eine wiederholte, lokale antiseptische oder antibiotische Therapie ausreichend, bei Ziegen dagegen ist eine parenterale Verabreichung von Antibiotika über mindestens zehn Tage, in schweren Fällen auch eine Langzeit-Antibiotikatherapie ( $\beta$ -Laktamantibiotika), erforderlich. Bei vermehrtem Auftreten von Staphylokokken-Pyodermien sind möglichst vor Einleitung der Antibiotikatherapie Resistenztestungen vorzunehmen. Ferner sollte die Schaf- oder Ziegenherde auf diese Erkrankung auslösende Faktoren überprüft werden (BEHRENS, 1987; BOSTEDT und DEDIÉ, 1996; BEHRENS et al., 2001).

YERUHAM et al. (1999) beobachteten bei Merino-Lämmern in Israel eine idiopathische Erkrankung, in deren Verlauf es zu einer generalisierten Ablösung von Hautpartien in Verbindung mit einem akuten Nierenversagen kam. Das Krankheitsbild ähnelte dem des „Staphylococcal Scaled Skin Syndrome“ (SSSS) des Menschen. Aus den Hautläsionen konnten *S. aureus* isoliert werden.

Sowohl bei Schaf- als auch bei Ziegenböcken (gelegentlich auch bei weiblichen Tieren) ist die äußere Haut an der Brustbeinregion plattenförmig verdickt und stellt einen schuppigen, faltigen Bereich dar. Besonders hier kann langes Liegen zu Drucknekrosen führen. Je schwerer und unbeweglicher die Böcke einer Rasse sind, desto häufiger können diese oberflächlichen Wunden entstehen. Kommt es zusätzlich zu einer Infektion mit Staphylokokken so entsteht eine tiefgreifende Pyodermie mit Nekrosen

und Abszessen bis hin zu Osteomyelitiden. Hierbei ist lediglich eine symptomatische Behandlung möglich, da die eigentliche Ursache dieser Erkrankung unbekannt ist (BOSTEDT und DEDIÉ, 1996).

Neben Hautinfektionen kann *S. aureus* bei Schafen und Ziegen Erkrankungen der weiblichen Geschlechtsorgane, insbesondere des Uterus, hervorrufen. Bei Erkrankungen des Uterus ist die Zervix in der Regel miteinbezogen. Dies wird klinisch als Endometritis-Zervizitis-Komplex bezeichnet. Eine Staphylokokken-Endometritis tritt meist als infiltrative oder exsudative Entzündung in Erscheinung, die anfänglich subklinisch verläuft und später in eine chronisch-rezidivierende Entzündung übergeht. Die Pyometra stellt die schwerste Form der Endometritis dar und kommt bei Schafen und Ziegen seltener vor. Sie wird meist anlässlich der sonographischen Graviditätsuntersuchung entdeckt. Bei Schafen und Ziegen handelt es sich häufig um die geschlossene Form der Pyometra in Verbindung mit einem Corpus luteum persistenz, wobei es infolge einer Kompression der Urethra und der so entstehenden Megavesica zu Miktionsstörungen kommen kann (BOSTEDT und DEDIÉ, 1996).

Infektionsherde mit Staphylokokken können, sofern sie ins Gehirn verschleppt werden, die Ursache für Gehirnabszesse sein und es kommt, abhängig von dem betroffenen Gehirnabschnitt, zu Symptomen wie spastische Parese (meist einseitig), Ataxie, Nystagmus und Kopffehlhaltungen. Zum Teil kommt es bei Schafen und Ziegen zu einer Absiedlung der Erreger in die Leber. Bei den Lämmern beruht dies häufig auf einer Abszedierung der Erreger aus einer Nabelentzündung. Diese Erkrankung verläuft subklinisch, die Tiere sind matt und verweigern die Nahrungsaufnahme bei druckempfindlichem Abdomen. Leberabszesse können bei älteren Tieren eine chronisch-schleichende Kachexie bedingen (BOSTEDT und DEDIÉ, 1996).

## **2.2 Mutmaßliche Pathogenitätsfaktoren von *S. aureus***

Pathogene Staphylokokken sind in der Lage, unterschiedliche Enzyme und Toxine zu bilden. Die Bandbreite dieser Virulenzfaktoren variiert zwischen den einzelnen Stämmen, so dass verschiedene Stämme unterschiedlich virulent sind (BOERLIN und

NICOLET, 2002). Bei den Staphylokokken gibt es zellgebundene sowie extrazelluläre Substanzen, welche biochemisch, zytologisch oder serologisch nachweisbar sind. Zu den zellgebundenen Pathogenitätsfaktoren gehören Plasmaproteinrezeptoren (LÄMMLER und BLOBEL, 1985), welche sich an der Bakterienoberfläche befinden und zur Bindung von Fibrinogen (DUTHIE, 1954; LÄMMLER, 1983), Immunglobulin (Ig) G (BOYLE, 1990), Fibronectin (RYDEN et al., 1983), Kollagen, Vitronectin, Laminin (PAULSSON et al., 1992a, b), Laktoferrin (NAIDU et al., 1990), Elastin (PARK et al., 1991) und anderen Proteinen fähig sind. Hierzu gehören auch das Protein A, welches zu einer Wechselwirkung mit Immunglobulinen führt (KRONVALL et al. 1970), sowie der Clumping-Faktor, welcher Fibrinogen bindet (KLOOS und SCHLEIFER, 1986). Weitere zellgebundene mutmaßliche Pathogenitätsfaktoren sind die Bekapselung und die Schleimproduktion der Bakterien (WILKINSON, 1983). Zu den extrazellulären Enzymen und Toxinen gehören unter anderem die Koagulase (LOEB, 1903), die Theronuklease (KLOOS und SCHLEIFER, 1986), Hämolsine (ELEK und LEVY, 1950), Enterotoxine (BALABAN und RASOOLY, 2000), epidermiolytische Toxine (PARKER, 1958), das Toxic Shock Syndrom Toxin (TSST-1) (ARBUTHNOTT et al., 1990), Leukozidine (WENK und BLOBEL, 1970), Lipasen (BRUNNER et al., 1981), die Staphylokinase und die Hyaluronidase (ABRAMSON, 1972). Die Synthese der Virulenzfaktoren findet bei *S. aureus* mit Hilfe des übergeordneten Regulationssystems *agr* statt (RECSEI et al., 1985). KORNBLUM et al. (1990) unterteilten diese Exoproteine in vier Klassen: Zu den Proteinen der Klasse 1 gehören das  $\alpha$ - und  $\delta$ -Hämolsin, TSST-1 und die Serinproteasen. Sie werden ausschließlich von *agr*<sup>+</sup>-Stämmen exprimiert.  $\beta$ -Hämolsin, Theronuklease und Enterotoxin B gehören zu den Proteinen der Klasse 2 und werden von *agr*<sup>+</sup>-Stämmen in großen, von *agr*<sup>-</sup>-Stämmen in kleineren Mengen exprimiert. In geringem Maße von *agr*<sup>+</sup>-Stämmen und hauptsächlich von *agr*<sup>-</sup>-Stämmen werden die Proteine der Klasse 3 exprimiert. Hierzu gehört das Protein A, das fibronectinbindende Protein und die Koagulase. Die Synthese der Klasse 4 Proteine Enterotoxin A und  $\beta$ -Lactamasen erwies sich als *agr*-unabhängig.



### 2.2.1 Hämolysine

Bei den Hämolysinen handelt es sich um membranzerstörende Exotoxine („membrane-damaging-toxins“), die in der Literatur auch als Zytolysine bezeichnet werden (McCARTNEY und ARBUTHNOTT, 1978). Diese Exosubstanzen schädigen Erythrozyten und andere Zellarten und bewirken bei der Anzüchtung der Bakterien auf Blutagarplatten eine Hämolysen, d.h. eine unterschiedlich starke Zersetzung von Erythrozyten. Die Unterscheidung der verschiedenen Hämolysine erfolgt neben der Beurteilung der Art ihrer Hämolysen auch nach Anzüchtung auf Blutagarplatten aufgrund synergistischer bzw. antagonistischer Wechselwirkungen mit Stoffwechselprodukten anderer Bakterienspezies (SKALKA et al., 1979; HÉRBERT und HANCOCK, 1985; LÄMMLER und BLOBEL, 1987).

Es werden vier, bzw. fünf Staphylokokken-Hämolysine, bezeichnet als  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$  und  $\delta$ -like Hämolysin bzw Toxin, unterschieden. Das  $\alpha$ -Hämolysin vermag laut ROLLE und MAYR (1993) die Erythrozyten von Kaninchen, Schaf, Rind und Ziege aufzulösen. Es handelt sich funktionell um ein hauptsächlich von *S. aureus* gebildetes wasserlösliches Polypeptid mit zytotoxischer Wirkung. Durch die Aneinanderlagerung von sechs Toxinmolekülen wird eine Ringstruktur ausgebildet, welche durch eine Einsenkung in die Zellmembran transmembranale Kanäle bildet und durch das Freisetzen von Ionen ein Platzen der Membran infolge osmotischer Lyse hervorruft (HARSHMAN et al., 1989; BHAKDI und TRANUM-JENSEN, 1991; BOERLIN und NICOLET, 2002). Das  $\alpha$ -Hämolysin wirkt nicht nur hämolytisch, sondern auch dermonekrotisch und neurotoxisch (ROGOLSKY, 1979). Laut JONSSON et al. (1985) ist das  $\alpha$ -Hämolysin einer der bedeutendsten Virulenzfaktoren von *S. aureus* und kommt bei Tieren häufig in Kombination mit dem  $\beta$ -Hämolysin vor. Für die Bildung des  $\alpha$ -Hämolysins sind das Vorhandensein von Glucose, der pH-Wert und der  $\text{CO}_2$ -Gehalt entscheidend. Das  $\beta$ -Hämolysin ist das bei tierpathogenen *S. aureus* am häufigsten vorkommende Hämolysin und löst laut ROLLE und MAYR (1993) die Erythrozyten von Rind, Schaf und Ziege auf. Das  $\beta$ -Hämolysin wird als Sphingomyelinase bezeichnet, da es sich bei diesem Toxin um eine Phospholipase C handelt. Das  $\beta$ -Hämolysin führt zu einer Membranschädigung durch Freisetzen von

Phosphorylcholin aus dem Sphingomyelin der Erythrozytenmembran und wirkt somit als Membrangift (FRITSCH, 1970; THELESTAM, 1983; BOERLIN und NICOLET, 2002). Das  $\gamma$ -Hämolysin gehört zur Gruppe der synergohymenotropen Toxine und besitzt nach Untersuchungen von SUPERSAC et al. (1993) eine stark inflammatorische Wirkung. GUYONNET et al. konnten 1968 bei 23 von 43 *S. aureus*-Kulturen tierischer Herkunft  $\gamma$ -Hämolysin nachweisen. Wie MÖLLBY (1983) berichteten wird das  $\gamma$ -Hämolysin durch sulfonierte Polymere (Agar, Heparin, Dextran-Sulfat) oder Lipide (Phospholipide, Fettsäuren, Cholesterol) gehemmt. Bei dem  $\delta$ -Hämolysin handelt es sich um ein aus 26 hydrophoben Aminosäuren bestehendes Polypeptid (FITTON et al., 1984), welches durch Bildung von Toxin-Hexameren zur Porenbildung in der Membran und somit zur Lyse der Erythrozyten (insbesondere von Mensch und Affe) infolge von Permeabilitätsstörungen führt (MELLOR et al., 1988). Neben seinen hämolytischen und leukozytenzerstörenden Eigenschaften besitzt das  $\delta$ -Hämolysin nach WADSTRÖM (1983) ebenfalls zellzerstörende Aktivität und wirkt für bakterielle Protoplasten, Lysosomen, Liposomen und Zellkulturen zytolytisch. Im Meerschweinchenversuch konnte neben der Permeabilitätssteigerung der Hautgefäße auch eine Hemmung der Wasserresorption durch Aktivierung der Adenylatcyclase im Ileum beobachtet werden (SCHMITZ et al., 1997c). MATTSON et al. (1996) und SCHMITZ et al. (1997c) entdeckten, dass das  $\delta$ -Hämolysin einen direkten Einfluß auf die Monozyten hat und die Produktion des „Tumor Necrosis Factor alpha“ (TNF- $\alpha$ ) induziert. Bei TNF- $\alpha$  handelt es sich um ein Zytokin, welches eine Reihe entzündlicher Veränderungen bis hin zum Schock hervorrufen kann. Das  $\delta$ -like Hämolysin wurde laut SCHEIFELE et al. (1987) zuerst im Zusammenhang mit *S. epidermidis*-Kulturen vom Menschen beschrieben und scheint für die nekrotisierende Enterokolitis von Neugeborenen verantwortlich zu sein.

### 2.2.2 Wechselwirkungen von *S. aureus* mit Fibrinogen

*S. aureus*-Kulturen sind in der Lage die extrazelluläre Substanz Koagulase und die Oberflächendeterminante Clumping-Faktor, ein fibrinogenbindendes Protein, zu bilden (MOREILLON et al., 1995). Die Koagulase wird von allen *S. aureus*-Kulturen produziert und dient in mikrobiologischen Labors als Hauptkriterium zur Identifizierung dieser Bakterien (KLOOS und SCHLEIFER, 1986). BRÜCKLER et al. (1994)

beschreiben die Koagulase als extrazelluläres Protein ohne Enzymcharakter. Durch die Bindung des Prothrombins (des sogenannten „coagulase reacting factors“) entsteht das „Staphylothrombin“, ein proteolytisch wirkender Komplex, welcher eine Abspaltung der Fibrinpeptide A und B vom Fibrinmolekül zur Folge hat und durch Polymerisation des Fibrinogens eine Koagulation des Plasmas bewirkt. Nach Untersuchungen von BOERLIN und NICOLET (2002) dient die Bildung von Fibrinklumpen zum Schutz der Staphylokokken vor dem Abwehrmechanismus des Wirts (z.B. vor der intraphagozytären Verdauung). Laut McDEVITT et al. (1992) kann die Koagulase sowohl Fibrinogen als auch Prothrombin binden, wobei die fibrinogebindende Domäne der zellgebundenen Koagulase im C-terminalen Bereich, die prothrombinbindende Region im Bereich des N-Terminus zu finden ist.

BRÜCKLER et al. (1994) beschrieben Koagulasen mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 90000 Da, bzw einem isoelektrischen Punkt (pI) zwischen 4,5 und 5,85. Diese Unterschiede können möglicherweise durch variierende Untersuchungsverfahren erklärt werden, oder ein Anzeichen für das Vorhandensein verschiedener Koagulasen sein. USHIODA et al. beschrieben 1981 acht serologisch unterscheidbare Koagulasen und bezeichneten diese mit I-VIII.

Das Koagulase-Gen (*coa*) codiert für ein Protein, welches am N-terminalen Ende aus einem die prothrombinbindende Region beinhaltenden und als Chymotryptic-43 kDa-Fragment bezeichneten Abschnitt besteht. Das C-terminale Ende besitzt einen konstanten Anteil (K) sowie eine variable Region (R), die für die Prothrombinbindung nicht benötigt zu werden scheint. Diese variable Region besteht aus einer unterschiedlichen Anzahl an sich wiederholenden Einheiten („Repeats“) (KAWABATA et al., 1986; KAIDA et al., 1989; GOH et al., 1992). Die Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau des Koagulase-Gens.

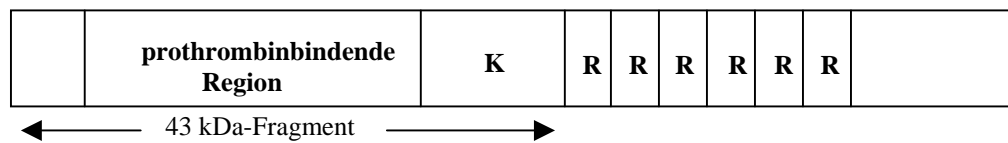


Abb. 1:

Schematische Darstellung des Koagulase-Gens von *S. aureus* nach Angaben von KAWABATA et al. (1986) und KAIDA et al. (1989). Der Buchstabe K bezeichnet den 330 Bp großen konstanten Anteil, der Buchstabe R die 81 Bp großen sich wiederholenden Einheiten („Repeats“) des *coa*-Gens.

Wie erstmals 1908 von MUCH beschrieben reagiert der Clumping-Faktor im Gegensatz zur Koagulase direkt mit dem Fibrinogen des Plasmas, ohne die Vermittlung eines Plasmafaktors, und führt so zu einer Verklumpung der Staphylokokken. DUTHIE (1954) stellte in seinen Untersuchungen fest, daß es sich bei dem auch als „gebundene Koagulase“ bezeichneten Clumping-Faktor und der eigentlichen „freien Koagulase“ um zwei verschiedene Substanzen handelt. Laut MOREILLON et al. (1995) ist der Clumping-Faktor an die Bakterienoberfläche gebunden und vermittelt direkt die Bindung an Fibrinogen und Fibrin. Bei dem Clumping-Faktor handelt es sich um ein Protein mit einem pI von 10,1-10,8 (USUI, 1986), er ist bis zu einer Temperatur von 100°C stabil und bei einem pH-Wert von 2-11 wirksam (USUI et al., 1985). Diese Autoren beschrieben für den Clumping-Faktor ein Molekulargewicht zwischen 60000 und 63000 Da, proteolytische Enzyme wie Trypsin, Papain und Pepsin zerstörten nach ROTTER und KELLY (1966) seine Aktivität. Clumping-Faktor-positive Staphylokokken können sich durch die Bindung von Fibrinogen mit dieser körpereigenen Substanz umhüllen und so als körperfremde Eindringlinge unerkant bleiben (BRÜCKLER et al., 1994). NI EIDHIN et al. (1998) beschrieben neben dem als Clumping-Faktor bekannten, fibrinogenbindenden Protein ClfA, welches ausschließlich mit den  $\gamma$ -Ketten des Fibrinogemoleküls reagiert, ein weiteres, als ClfB bezeichnetes Protein. ClfB erwies sich ebenfalls als ein an der Oberfläche von *S. aureus* lokalisiertes, 124000 Da großes Protein, welches an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des Fibrinogens bindet. Beide Proteine haben Sequenzähnlichkeiten bezüglich ihrer Signalsequenz und der zellwandgebundenen Bereiche. ClfB konnte bislang, nach NI EIDHIN et al. (1998), nur bei *S. aureus* der frühen exponentiellen Phase nachgewiesen werden, nicht jedoch während der späten exponentiellen oder stationären Phase.

MOREILLON et al. (1995) untersuchten die Staphylokokkenkoagulase und den Clumping-Faktor im Zusammenhang mit infektiösen Endokarditiden und stellten fest, dass insbesondere der Clumping-Faktor bei der Pathogenese der durch *S. aureus* hervorgerufenen Endokarditis eine spezifische Rolle spielt. Die Bildung der Koagulase und des Clumping-Faktors erleichterten den in der Blutbahn zirkulierenden *S. aureus* die direkte Anheftung, insbesondere an vorgeschädigten Herzklappen.

### 2.2.3 Protein A

BRÜCKLER et al. (1994) beschrieben das Protein A als eine Substanz, die von fast allen *S. aureus*-Kulturen gebildet und zur Differenzierung von *S. aureus* gegenüber anderen Staphylokokkenarten genutzt wird. Das Protein A kommt an der Zelloberfläche vor, kann jedoch auch extrazellulär nachgewiesen werden. Es reagiert mit den Fc-Stücken des IgG und hemmt dadurch indirekt, durch Blockierung des Fc-Stücks, die Phagozytose (SJÖQUIST et al., 1972b; BOERLIN und NICOLET, 2002). Weiterhin wirkt das Protein A chemotaktisch auf polymorphkernige Leukozyten und fördert die Eiterbildung. Das Molekulargewicht beträgt 42000 Da (SJÖQUIST et al., 1972a) der pI liegt bei 5,1 (LINDMARK et al., 1977).

Nach UHLÉN et al. (1984) besteht das chromosomal kodierte Protein A am aminoterminalen Ende aus einer Signalsequenz (S), fünf IgG-bindenden Einheiten (1-5), sowie der zellwandassoziierten X-Region. Diese X-Region setzt sich aus einem repetitiven Anteil (Xr) mit einer unterschiedlichen Zahl von sich wiederholenden Einheiten („Repeats“) und einem funktionell als Membrananker bezeichneten konstanten Anteil am C-terminalen Ende (Xc) zusammen. SHOPSIN et al. führten 1999 Sequenzanalysen der X-Region des Protein A-Gens durch und fanden ebenfalls eine polymorphe X-Region aus einer variablen Anzahl an kurzen, sich wiederholenden, 24 Bp großen Einheiten. Die von dem Genabschnitt der X-Region kodierte Protein A-Domäne scheint den N-terminalen IgG-bindenden Bereich des Proteins durch die Zellwand hindurch zu verlängern. In der Abbildung 2 ist das Protein A-Gen schematisch dargestellt.

<b>S</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>Xr</b>	<b>Xc</b>
----------	----------	----------	----------	----------	----------	-----------	-----------

Abb. 2:

Schematische Darstellung des *spa*-Gens nach UHLÉN et al. (1984). Der Buchstabe S bezeichnet den die Signalsequenz kodierenden Teil, Xr den 24 Bp großen, repetitiven Anteil und Xc den konstanten Anteil des Gens. Die fünf IgG-bindende Einheiten kodierenden Anteile des *spa*-Gens sind mit 1-5 gekennzeichnet.

#### 2.2.4 Thermonuklease und Hyaluronidase

Thermonukleasen werden von allen *S. aureus*-Kulturen gebildet, so daß ihr Nachweis als diagnostisches Kriterium zur Abgrenzung von *S. aureus* gegenüber anderen Staphylokokken genutzt werden kann (KLOOS und SCHLEIFER, 1986). Bei den *S. aureus*-Nukleasen handelt es sich um Phosphodiesterasen die an den Polynukleotidketten der DNA und der RNA angreifen und diese in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  zu 3'-Phosphomononukleotiden hydrolysieren (HEINS et al., 1967; ANFINSEN et al., 1971). So können sie in den betroffenen Körperzellen die Zellfunktion stören (BRÜCKLER et al., 1994). Der Abbau nativer DNA erfolgt hierbei wesentlich langsamer als der Abbau der denaturierten DNA.

Die hitzestabilen Nukleasen widerstehen laut CUNNINGHAM et al. (1956) selbst minutenlanges Kochen ohne Aktivitätsverlust. BRAKSTAD et al. (1992) konnten selbst nach ein stündigem Kochen bei 100°C keinen Aktivitätsverlust beobachten. TUCKER et al. (1978) und BRAKSTAD et al. (1992) beschrieben für die Thermonuklease ein Molekulargewicht von 17000 Da.

Die Hyaluronidase wird ebenfalls von nahezu allen koagulasepositiven, pathogenen Staphylokokken gebildet (ABRAMSON und FRIEDMAN, 1969; ABRAMSON, 1972; ARVIDSON, 1983). Laut ABRAMSON (1972) bewirkt die Hyaluronidase durch den Abbau saurer Mukopolysaccharide und der Auflösung der interzellulären Kittsubstanz eine Herabsetzung der Gewebeviskosität, wodurch die Ausbreitung der Staphylokokken

im Gewebe erleichtert wird. Die Angaben für das Molekulargewicht der Hyaluronidase liegen zwischen 50000 (HALLANDER, 1963) und 84000 Da (RAUTELA und ABRAMSON, 1973), die für den pI zwischen 7,4 und 7,9 (VESTERBERG, 1968) bzw. bei 9,9 (ABRAMSON und FRIEDMAN, 1969).

### 2.2.5 Enterotoxine

Bei den Staphylokokkenenterotoxinen (SE) handelt es sich, gemeinsam mit dem „Toxic Shock Syndrom Toxin“ (TSST) sowie einigen Streptokokkenexotoxinen um eine Gruppe unterschiedlicher Stoffwechselprodukte, die Ähnlichkeiten in ihrer Struktur, Funktion und Sequenz aufweisen. Die SE gehören zu einer größeren Gruppe von Pyrotoxinen (PT) und können Lebensmittelintoxikationen, toxischen Schock sowie verschiedene allergische und autoimmune Erkrankungen hervorrufen (MARR et al., 1993; BALABAN und RASOOLY, 2000). Allen Enterotoxinen gemeinsam ist ihre Manifestation im Verdauungstrakt (OTERO et al., 1990; UNTERMANN, 1994) und ihre Wirkung als Superantigen, d.h. sie führen zu einer unspezifischen T-Zell-Proliferation. Aufgrund ihrer Genstruktur unterscheidet man bislang die Toxine SEA bis SEE und SEG bis SEO (BALABAN und RASOOLY, 2000; FITZGERALD et al., 2001; JARRAUD et al., 2001; ORWIN, 2001). SVENSSON et al. (1997) teilten die Toxine aufgrund von Sequenzanalysen in zwei Unterfamilien ein: Hiernach bilden die Toxine SEB und SEC1 bis SEC3 die eine, und die Toxine SEA, SED, SEE und SEH die andere Untergruppe. Ihre Bildung findet überwiegend in der postexponentiellen Wachstumsphase statt, wobei sich ihre Expression durch drei unterschiedliche Regulationssysteme kontrolliert. Jedes Toxin wird als Vorläufer-Toxin in der Bakterienzelle gebildet und mit einer Signalsequenz ausgestattet, welche beim Transport aus der Zelle abgespaltet wird. Die eigentlichen Toxine sind einfache Proteine, die aus einer Polypeptidkette mit einem hohen Gehalt an Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Tyrosin bestehen und ein Molekulargewicht von 20-30000 Da aufweisen (OTERO et al., 1990; BRÜCKLER et al., 1994). Ein allen SE gemeinsames Strukturmerkmal ist eine als „Disulfid-Loop“ oder „Cystin-Loop“ bezeichnete Aminosäureschleife, welche durch eine Disulfidbrücke im Zentrum gebildet wird und deren Aminosäureanzahl und Sequenz bei allen Enterotoxinen verschieden ist. Weiterhin zeichnen sie sich durch besondere Stabilität gegenüber

proteolytischen Enzymen wie Trypsin, Chymotrypsin, Renin und Papain aus. Da die Enterotoxine sehr hitzestabil sind und eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber proteolytischen Enzymen besitzen, werden sie weder nach oraler Aufnahme beim Verdauungsprozeß noch beim normalen Kochprozeß zerstört. Selbst bei der Herstellung von Vollkonserven kann unter Umständen die biologische Aktivität der Enterotoxine erhalten bleiben. Neben der Temperaturerhöhung beeinflussen der pH-Wert und die Zusammensetzung des Lebensmittels die Thermostabilität der Staphylokokken-enterotoxine (BERGDOLL, 1989; BENNET, 1992; BRÜCKLER et al., 1994; BALABAN und RASOOLY, 2000).

SEA stellt nach Untersuchungen von BALABAN und RASOOLY (2000) mit 77 % das im Rahmen von Lebensmittelvergiftungen in den USA am häufigsten nachgewiesenste Staphylokokkenenterotoxin dar, gefolgt von SED (37,5 %) und SEB (10 %). Laut MONDAY und BOHACH (1999b) sowie UNTERMANN (1994) hat SEA eine Molekülmasse von 27100 Da und einen pI bei 6,8-7,3. Das Gen für SEA liegt auf einem Bakteriophagen, besteht aus 771 Basenpaaren und kodiert ein Protein mit 257 Aminosäuren (BETELEY und MEKALANOS, 1988; BALABAN und RASOOLY, 2000). BALABAN und RASOOLY (2000) beschrieben drei Formen von SEA, die sich lediglich in ihren isoelektrischen Punkten unterscheiden. SEA bindet an „major histocompatibility complex“ (MHC) II-Moleküle von „antigen presenting cells“ (APCs) und führt so zu einer Aktivierung der T-Lymphozyten und Ausschüttung der Zytokine Interleukin (IL1, IL2),  $\gamma$ -Interferon, und Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ) (SVENSSON et al., 1997; BALABAN und RASOOLY, 2000). Die Expression des Gens *sea* wird jedoch, im Gegensatz zu der Expression der Gene *seb*, *sec* und *sed*, nicht von dem akzessorischen Genregulator *agr* reguliert (BALABAN und RASOOLY, 2000).

SEB hat ein Molekulargewicht von 28336 Da und einem pI von 8,6 (SVENSSON et al., 1997; MONDAY und BOHACH, 1999b). SVENSSON et al. (1997) sowie BOHACH und SCHLIEVERT (1987) stellten bei der Untersuchung der Strukturen von SEB und SEC große Ähnlichkeiten fest. Laut BALABAN und RASOOLY (2000) ist das Gen für SEB chromosomalen Ursprungs, besteht aus ca. 900 Nukleotiden und kodiert ein 267 Aminosäuren großes Protein.



Bei den SEC-Toxinen handelt es sich nach BALABAN und RASOOLY (2000) um eine größere Untergruppe von verschiedenen Proteinen, die immunologische Kreuzreaktionen aufweisen. BOHACH und SCHLIEVERT (1987), MARR et al. (1993), EDWARDS et al. (1997) und SCHAD et al. (1997) beschrieben für SEC die Varianten SEC1, SEC2, SEC3, SEC-bovine, SEC-ovine und SEC-canine, die sich in ihrem Molekulargewicht und isoelektrischen Punkt unterschieden. MARR et al. entdeckten 1993 signifikante immunologische Kreuzreaktionen zwischen den drei SEC Subtypen SEC1, SEC2 und SEC3 und vermuteten die Existenz von fünf weiteren Subtypen mit verschiedenen isoelektrischen Punkten. Laut MONDAY und BOHACH (1999b) haben die SEC-Subtypen ein Molekulargewicht von ca. 27500 Da, ihre isoelektrischen Punkte liegen zwischen 7,0 und 8,6 (SEC1: 8,6; SEC2: 7,0; SEC3: 8,0-8,2; SEC-bovine und SEC-ovine: 7,6; SEC-canine: 7,0). Alle SEC Subtypen verursachen Lymphozytenproliferation, stimulieren jedoch unterschiedliche Zellen (MARR et al., 1993). BALABAN und RASOOLY (2000) stellten fest, dass das für SEC3 kodierende Gen aus 801 Basenpaaren besteht und ein Protein kodiert, das aus 267 Aminosäuren aufgebaut ist. SEC3 und SEC2 unterschieden sich in 4 Aminosäuren, SEC3 und SEC1 in neun Aminosäuren (BALABAN und RASOOLY, 2000).

MONDAY und BOHACH (1999b) wiesen für SED ein Molekulargewicht von 26360 Da und einen pI bei 7,4 nach. BALABAN und RASOOLY (2000) beschrieben für SED eine dreidimensionale Struktur, welche der Struktur der anderen Superantigene ähnelte. Dieses Enterotoxin hat die Fähigkeit in Anwesenheit von Zinkionen Dimere zu bilden, welche eine große Affinität zur Interaktion mit MHC-Klasse-II Molekülen aufweisen. SED-bildende *S. aureus* besitzen alle ein relativ großes, *sed*-tragendes, penicillinase-kodierendes Plasmid (MONDAY und BOHACH, 1999b). Durch Sequenzierung des Plasmids piB485 konnte die Sequenz von *sed* ermittelt werden, wobei ein weiteres, erstmalig von ZHANG et al. (1998) beschriebenes, Entertoxin-Gen *sej* entdeckt wurde. Nach BALABAN und RASOOLY (2000) besteht das Genprodukt von *sed* aus 258 Aminosäuren.

Das Enterotoxin E hat ein Molekulargewicht von 26425 Da und einen pI bei 8,5. Sequenzanalysen zeigten eine nahe Verwandtschaft (81 %) zu SED und SEA (MONDAY und BOHACH, 1999b; BALABAN und RASOOLY, 2000).

Wie in der Arbeit von MONDAY und BOHACH (1999a, b) dokumentiert, weist SEG ein Molekulargewicht von 27042 Da und SEI von 24928 Da auf. MUNSON et al. (1998) beschrieben erstmalig gemeinsam die Enterotoxintypen G und I bei *S. aureus*, isoliert aus Nasentupfern von Bewohnern der Osterinseln. Dabei ergaben Nukleotidsequenzanalysen für das *seg*-kodierende Gen eine Größe von 774 Bp. Das Toxin besteht aus 258 Aminosäuren, das SEI-kodierende Gen hatte eine Größe von 726 Bp und 242 Aminosäuren. Sequenzanalysen ergaben im weiteren Ähnlichkeiten zwischen SEG, SEB und SEC sowie zwischen SEI, SEA, SEE und SED. JARRAUD et al. (1999, 2001) beschrieben, dass die Gene für die Staphylokokkenenterotoxine G und I nahe beieinander auf einem 3,2 Kb-großen DNA Fragment liegen und durch eine „intergenic spacer“-Region getrennt sind.

AB et al. beschrieben 2000 das Gen *segv*. Bei diesem Gen handelte es sich um eine *seg*-Variante, welche ein Protein (SEGV) mit 233 Aminosäuren kodiert und 97,7 % Ähnlichkeit zu *seg* aufweist.

SU und WONG (1995) isolierten SEH mittels chromatographischer Methoden aus dem Kulturüberstand und ermittelten ein Molekulargewicht von 28500 Da sowie einen pI von 5,7. MONDAY und BOHACH (1999b) ermittelten für SEH ein Molekulargewicht von 25145. Im Affenversuch hatte das gereinigte SEH in einem Zeitraum von ein bis drei Stunden nach der Aufnahme eine emetische Wirkung. Durch spezifische Antiseren konnte seine Toxizität neutralisiert werden. Die optimale Bildung von SEH erfolgte bei Sauerstoffanwesenheit und einem pH-Wert von 7,0. SU und WONG (1995) etablierten im weiteren ein ELISA-Test-System zum Nachweis des Enterotoxin H, ab einer Konzentration von 2,5 ng/ml. REN et al. (1994) isolierten und charakterisierten SEH aus dem Kulturüberstand einer TSST-1-negativen *S. aureus*-Kultur, welche von einem Patienten mit Toxischem Schock Syndrom gewonnen werden konnte. SEH erwies sich als ein Protein mit einer Größe von 25145 Da und einem pI von 5,65. Das SEH-Antiserum wies keine Reaktion mit SEA, B, C, D, E oder TSST-1 auf. Die Basen- bzw. Aminosäuresequenz des Toxins konnten nach Klonierung und Sequenzierung bestimmt werden und sind den Gendatenbanken der NCBI zu entnehmen. *Seh* besteht aus 654 Bp, kodiert ein Protein mit 218 Aminosäuren und zeigt mit SEE (38 %), SEA (37 %), SED (37 %), SEB (33 %) und SEC (27 %) Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz. Bislang ist aufgrund weitestgehend fehlender Basen- bzw. Aminosäuresequenzdaten

unklar, ob das von SU und WONG (1995) beschriebene SEH identisch mit dem von REN et al (1994) beschriebenen SEH ist. Die PCR-*seh*-Nachweisverfahren beziehen sich ausschließlich auf die von REN et al (1994) verwendeten Sequenzdaten. MONDAY und BOHACH (1999a) etablierten eine Multiplex-PCR und zitierten die SEH-Publikation von SU und WONG (1995), verwendeten aber die Datenbanksequenz von REN et al. (1994). JARRAUD et al. (1999) nutzten ebenso die Datenbankeintragen von REN et al. (1994) sowie als Kontrollstamm den Referenzstamm FRI-569 von SU und WONG (1995). Eine weitere Charakterisierung der superantigenen Eigenschaften von SEH erfolgte durch NILSSON et al. (1999), HAKANSSON et al. (2000) und PETERSSON et al. (2001). Diese Autoren beschrieben SEH als ein T-Zellmitogen welches, verglichen mit allen beschriebenen Enterotoxinen, die höchste Affinität zu MHC Klasse II Molekülen besitzt. Die Bindung ist von der Anwesenheit von Zinkionen abhängig.

Bei SEJ handelt es sich um ein aus 269 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 31210 Da mit Ähnlichkeiten zu SEA, E und D. Dieses Toxin wird ebenso wie SED durch ein Plasmid kodiert, auf dem *sed* und *sej* durch eine 895 Nukleotid-große Region getrennt sind. Zwar werden beide Gene von *S. aureus* exprimiert, scheinen aber einer unterschiedlichen Regulation zu unterliegen. Durch PCR-Amplifikationen konnte bewiesen werden, dass alle *sed*-tragenden Plasmide auch *sej* tragen (ZHANG et al., 1998).

Die Gen- und Proteinsequenz von SEK wurde erstmals von LINDSAY et al. (1998) im Rahmen von Untersuchung einer TSST-1-Pathogenitätsinsel veröffentlicht. Eine weitere Charakterisierung erfolgte durch ORWIN et al. (2001). SEK hat ein Molekulargewicht von 26000 Da, einen pI zwischen 7,0 und 7,5 und zeigt Übereinstimmungen mit dem von ORWIN et al. (2001) untersuchten, aber noch nicht näher charakterisierten SEL und SEI auf. SEK hatte ähnliche Eigenschaften wie die übrigen SE, erwies sich ebenso als pyrotoxisches Superantigen und konnte den letalen Effekt von Endotoxinen verstärken.

In der Gendatenbank wird das von JARRAUD et al. (2001) beschriebene SEL nunmehr als SEO geführt. *Sel* kodiert nach FITZGERALD et al. (2001) das Gen für ein

enterotoxinähnliches Toxin, welches mit *tst*, *sec* und verschiedenen anderen Genen eine Pathogenitätsinsel bildet.

SEM wurde 2001 von JARRAUD et al. beschrieben. Im Gegensatz zu SEN und SEO (ehemals SEK und SEL) ist seine Benennung in der Publikation und Gendatenbank einheitlich. SEM zeigt, im Gegensatz zu SEN und SEO, Ähnlichkeiten in der Basen- und Aminosäuresequenz zu SEI.

SEN entspricht dem von JARRAUD et al. (2001) beschriebenen SEK und zeigt Übereinstimmungen in der Basen- und Aminosäuresequenz zu SEA, E, J, D und O (ehemals SEL).

SEO entspricht dem von JARRAUD et al. (2001) beschriebenen SEL. Die Basen- und Aminosäuresequenz von SEO (ehemals SEL) zeigt Ähnlichkeiten mit SEA, E, J, D und N (ehemals SEK).

JARRAUD et al. stellten 2001 im Rahmen von Sequenzanalysen fest, dass *seg*, *sei*, *sen* (ehemals *sek*), *seo* (ehemals *sel*) und *sem* gemeinsam auf einem Operon liegen und bezeichnete dies als „enterotoxic gene cluster“ (*egc*). Innerhalb der neu beschriebenen Enterotoxine G bis O scheint, obwohl hierzu bislang nur sehr wenige Arbeiten vorliegen, insbesondere der *egc*-Komplex von besonderer Bedeutung zu sein. Die Gene *seg* und *sei* treten dabei überwiegend gemeinsam, in einigen Fällen aber auch alleine auf. Über das ausschließliche Auftreten von *sem*, *sen* und *seo* liegen bislang noch keine Ergebnisse vor. Der *egc*-Komplex bzw. die Gene *seg* und *sei* konnten bislang bei *S. aureus*-Isolaten vom Tier nachgewiesen werden (AKINEDEN et al., 2001).

### 2.2.6 „Toxic Shock Syndrom Toxin“ (TSST)

Wie die oben erwähnten Staphylokokkenenterotoxine gehört auch TSST zur Gruppe der pyrotoxischen Superantigene. Laut BRÜCKLER et al. (1994) ist TSST-1 ein pyrogenes Toxin, welches von 10-29 % der untersuchten, vom Menschen isolierten *S. aureus*-Kulturen gebildet wurde. Über *S. aureus* im Zusammenhang mit dem „Toxic Shock Syndrome“ (TSS) wurde erstmals von TODD et al. (1978) berichtet. Unter TSS versteht

man eine akute Krankheit, die verschiedene Organsysteme beeinflussen kann und beim Menschen mit hohem Fieber sowie Haut- und Schleimhautsymptomen (Konjunktivitis, scarlatiniformes Exanthem und später Desquamation) einhergeht. Im weiteren Verlauf kann es zu Bewußtseinstörung, Erbrechen und Diarrhoe sowie zum hypovolämischen Schock kommen. Die Folge sind Leber- und Nierenschäden bis hin zum Tod. Das erste Auftreten von TSS wurde in den USA bei Frauen im Zusammenhang mit der Menstruation, bzw. hier in Verbindung mit der Benutzung von Tampons beobachtet. Später trat TSS wesentlich häufiger im Rahmen von Infektionskrankheiten und insbesondere nach Wundinfektionen auf. Der genaue Pathogenitätsmechanismus dieser Form von TSS ist bisher noch unklar (MONDAY und BOHACH, 1999b; DAGHISTANI et al., 2000; DINGES et al., 2000)

HO et al. (1989b) und LEE et al. (1992) entdeckten einen Schaf-assoziierten *S. aureus* Stamm, der ein TSST-1 Antikörper-bindendes Protein produzierte. Dieses Protein schien mit TSST-1 hinsichtlich seines Molekulargewichts und der immunologischen Reaktivität identisch zu sein, sein pI lag jedoch bei 8,5-8,6 und somit über dem für TSST-1 charakteristischen Wert von 7,0-7,2. Diese Variante des TSST-1 konnten HO et al. (1989a) bei 18 Schaf und 12 Ziegenstämmen nachweisen. Die meisten TSST produzierenden *S. aureus* von Schaf und Ziege erwiesen sich ebenso als SEC-Bildner, nur einige wenige produzierten entweder TSST oder eines der anderen Enterotoxine (ADESIYUN, 1992; ORDEN et al., 1992a).

Nach Untersuchungen von LEE et al. (1992) ergaben Nukleotidsequenzanalysen von TSST-1 und TSST-ovine 14 nicht übereinstimmende Nukleotide und daraus folgend neun unterschiedliche Aminosäuren. Im weiteren reagierte TSST-ovine weniger stark mit gegen TSST-1 gerichteten Antikörpern. LEE et al. (1992) konnten weiterhin aufzeigen, dass sowohl TSST-ovine als auch TSST-1 mitogen sind, aber nur TSST-1 pyrotoxisch ist. TSST-ovine schien somit nicht in der Lage zu sein einen toxischen Schock zu induzieren.

FITZGERALD et al. 2001 beschrieben die 15891 Bp große Pathogenitätsinsel SaPIbov, welche die Gene *tst* und *sec* beinhaltet.

### 2.2.7 Exfoliative Toxine

Laut DAJANI (1972) kommt das exfoliative bzw epidermolytische Staphylokokkentoxin (ET) vorzugsweise bei *S. aureus*-Stämmen vor, die im Zusammenhang mit Hautinfektionen des Menschen („Impetigo conatagiosa“ bei Erwachsenen oder „toxische Nekrose“ bei Kindern) isoliert wurden. Bekannt sind bisher die zwei Serotypen, ETA und ETB, wobei die meisten *S. aureus*-Kulturen nur eins der beiden Toxine produzieren. Der pI beider Serotypen liegt bei 7,0, die Molekulargewichte zwischen 24000 und 33000 Da (JOHNSON et al., 1975; BRÜCKELR et al., 1994). KONDO et al. (1974) beschreiben ETA als hitzestabiles und ETB als hitzelabiles Toxin.

ETA und ETB stehen im Zusammenhang mit einer Erkrankung, die als „staphylococcal scaled skin syndrom“ (SSSS) bezeichnet wird. Diese Erkrankung betrifft besonders die Haut von Neugeborenen (exfoliative Dermatitis der Neugeborenen), Kindern oder Patienten mit Immunsuppression bzw. mit hochgradiger Niereninsuffizienz und hat eine generalisierte Trennung des Stratum corneum vom Stratum spinosum zur Folge. Das klinische Bild beinhaltet eine Blasenbildung der geröteten Haut, ähnlich einer Verbrühung durch kochendes Wasser und geht mit Fieber einher. Diese Blasen sind mit erregerefreier Flüssigkeit gefüllt und heilen innerhalb von sieben bis zehn Tagen meist narbenfrei ab (PIÉMONT, 1999). Untersuchungen von PIÉMONT (1999) ergaben, dass der äußere Anteil der Epidermis bei diesen Läsionen zunächst teilweise noch intakt ist, nach Berührung zeigt sich jedoch, dass zwischen der Epidermis und den tiefer liegenden elastischen Fasern keine Verbindung mehr besteht. Diese Eigenschaft trägt den Namen „Nikolsky-Zeichen“.

Laut JOHNSON et al. (1991) haben ETA und ETB identische biologische Eigenschaften sowie Ähnlichkeiten in den Gensequenzen. Das ETA-kodierende-Gen ist chromosomalen Ursprungs, das ETB-kodierende-Gen dagegen ist an ein Plasmid gebunden. PIÉMONT, beschrieb 1999 im Rahmen einer Sequenzanalyse eine 40 %ige Übereinstimmung zwischen ETA und ETB, konnte jedoch keine Ähnlichkeit zu Sequenzen anderer Bakterientoxine feststellen. Die genaue Wirkungsweise der ET ist derzeit noch nicht geklärt. Sie gelten als sehr spezies- und gewebespezifisch und

reagieren ausschließlich mit keratinisierten Epithelien, die vorzugsweise von neugeborenen Tieren bzw. Menschen stammen. Möglicherweise spalten die ET's die Desmosomen, die normalerweise die Zellen des Stratum spinosum der Haut verbinden, und vergrößern somit die interzellulären Zwischenräume. Zelläsionen sowie enzymatische oder metabolische Aktivitäten konnten bislang nicht beobachtet werden (PIÉMONT, 1999).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien, Biochemika und Verbrauchsmaterial

Agarose NEEO	(Roth, Art. Nr. 2267.4)
Ethanol	(Merck, 100983)
Ethidiumbromid-Lösung (5 U/ $\mu$ l)	(Sigma, E1510)
Harnstoff	(Roth, 3941.2)
Loading-Dye Solution	(MBI Fermentas, R0801)
Lysostaphin	(Sigma, L7386)
Magnesiumchlorid	(25 mmol/l) (Promega, A351B/ 11942710)
Natriumchlorid-Lösung	(0,14 mol/l) (Merck, 6404.1000)
Nitrozellulosemembran	(0,4 $\mu$ m, Protran BA85) (Schleicher und Schüll, CB0021-1/10401196)
Reaktionsgefäße-Multiply PCR-Gefäße (0,5 ml)	(Sarstedt, 72.735.992)
Reaktionsgefäße	(1,5 ml) (Sarstedt, 72.690)

Alle weiteren im Text erwähnten Chemikalien wurden von der Firma Merck in der Reinheitsstufe p.a. bezogen.

##### 3.1.2 Lösungen und Puffer

Inkubationspuffer	(10 fach) (Promega, M190A/ 10275027)
Natrium-Zitrat-Lösung (4 %)	(Merck, 106448)
TE-Puffer:	Tris-HCl (10 mmol/l) (Roth, Art. Nr. 4855.2) EDTA ( 1 mmol/) (Sigma, E-5134)
TAE-Puffer:	42 g Tris-Basis (Roth, 106030) 57,1 ml Eisessig (100%) (Merck, 100066) 100 ml EthyleneDiamineTetraaceticAcid (EDTA) (0,5 mol/l) (Sigma, E7889)



### **3.1.3 Bakterienkulturen**

#### **3.1.3.1 Isolate vom Schaf**

In der vorliegenden Arbeit wurden 42 *S. aureus*-Isolate vom Schaf untersucht. Dabei waren sechs Kulturen freundlicherweise von Herrn Dr. M. Zschöck und Frau Dr. B. Kloppert (Staatliches Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Mittelhessen, Gießen), sowie eine Kultur von Herrn Dr. H. Bocklisch und Frau Dr. S. Schött (Tiergesundheitsdienst Thüringen e.V., Bad Langensalza) zur Verfügung gestellt. Diese Kulturen stammten aus der Milch klinisch unauffälliger Schafe, isoliert im Rahmen von Routinekontrollen.

Desweiteren wurden 21 Kulturen von Frau Dr. P. Winter und Frau F. Giffinger (Medizinische Universitätsklinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Universität, Wien) übersandt. Von diesen 21 Kulturen stammten drei Kulturen aus der Milch mastitiskranker Schafe und die restlichen 18 Kulturen aus der Milch gesunder Schafe, isoliert im Rahmen von Routineuntersuchungen. Weitere 14 Kulturen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Ch. Dodd (Division of Food Sciences, University of Nottingham, Nottingham, UK) zur Verfügung gestellt, davon sieben Kulturen isoliert aus Milchproben mastitiskranker Schafe und weitere sieben Kulturen isoliert von gesunden Schafen (vier Kulturen aus dem Nasenraum, zwei Kulturen von der Euterhaut und eine Kultur aus einer Milchprobe).

#### **3.1.3.2 Isolate von der Ziege**

Von den fünf untersuchten Ziegenisolaten stammten zwei Kulturen vom Staatlichen Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Mittelhessen, Gießen, zwei Kulturen vom Tiergesundheitsdienst Thüringen e.V., Bad Langensalza, und eine Kultur von der Medizinischen Universitätsklinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Universität, Wien. Die Kulturen waren aus der Milch mastitiskranker Ziegen isoliert worden.

### 3.1.3.3 Sonstige verwendete Bakterienkulturen

Desweiteren wurden die *S. aureus*-Kulturen SEA (interne Nomenklatur: 619/93), SEB (62/92), SEC (1229/93), SED (1634/93), SEE-FRI (918), ETA/ETB (114/98), TSST1 (161/93) (freundlicherweise überlassen von Prof. Dr. W. Witte, Robert Koch-Institut, Werningerode), SEH (990552), SEG/SEI (990055) (freundlicherweise von Herrn S. Jarraud, Centre National de Référence des Toxémies Staphylococciques, Faculté de Medicine, Lyon, Frankreich zur Verfügung gestellt), SEJ (2724) (Staatliches Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Mittelhessen, Gießen), sowie die *S. aureus*-Kulturen COWAN I ATCC 12598 und *PERTSCH* in die Untersuchungen miteinbezogen. Die ebenfalls verwendete *S. epidermidis*-Kultur ATCC 14990, die *S. intermedius*-Kultur 6, sowie die *Streptococcus equi* subspezies *zooepidemicus*-Kultur W60 wurden der Stammsammlung des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften, Justus-Liebig-Universität, Gießen entnommen.

### 3.1.4 Nährmedien und Zusätze

Blutagar-Basis	(Merck, Art. Nr. 1.10886.0500)
Caseinpepton-Sojamehlpepton Agar	(Merck, Art. Nr. 1.05458.05000)
DNase Testagar	(Difco, 0632)
Eigelb-Tellurit-Emulsion	(Merck, Art. Nr. 1.03785.0001)
Hirn-Herz-Glucose-Bouillon	(BHI-Medium) (Oxoid, Art. Nr. CM225)
Mannit-Kochsalz-Phenolrot Agar	(Merck, Art. Nr. 1.05404.0500)
Müller-Hinton Agar	(Oxoid, Art. Nr. CM0337B)
Pepton aus Casein	(Merck, Art. Nr. 1.07216.1000)
Staphylokokken-Selektivagar nach Baird Parker	(Merck, Art. Nr. 1.05106.0500)
Steriles Kaninchenblut (aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU-Gießen)	
Toluidinblau O (C. I. 520040)	(Merck, Art. Nr. 1.15930.0025)

### 3.1.5 dNTP und Oligonukleotidprimer

dNTP: dATP (Roth, K035.1)

dTTP (Roth, K036.1)

dGTP (Roth, K037.1)

dCTP (Roth, K038.1)

Staur4 (Gibco, B1223E03)

Staur6 (Gibco, B1223E04)

STAA-AUI (Roth, C7081)

STAA-AUII (Roth, C7082)

Sa442-1 (MWG Biotech, 22-15071/2)

Sa442-2 (MWG Biotech, 22-15072/2)

clfAI (Gibco, B6845G09)

clfAII (Gibco, B6845G10)

nucAI (MWG Biotech, 28-3509-3/4)

nucAII (MWG Biotech, 28-3509-4/4)

coaI (MWG Biotech, 17-4505-4/4)

coaII (MWG Biotech, 17-4505-3/4)

spaIII (Gibco, B0877F12)

spaIV (Gibco, B0877F13)

SEA1 (Gibco, B1809C05)

SEA2 (Gibco, B1809C06)

SEB1 (Gibco, B1809C07)

SEB2 (Gibco, B1809C08)

SEC1 (Gibco, B1809C09)

SEC2 (Gibco, B1809C10)

SED1 (Gibco, B1809C11)

SED2 (Gibco, B1809C12)

SEE1 (Gibco, B1809C05)

SEE2 (Gibco, B1809C06)

SEG1 (Gibco, B0289C01)

---

SEG2	(Gibco, B0289C02)
SEH1	(Gibco, B0289C03)
SEH2	(Gibco, B0289C04)
SEI1	(Gibco, B0289C05)
SEI2	(Gibco, B0289C06)
SEJ1	(MWG Biotech, 21-3540-3/6)
SEJ2	(MWG Biotech, 21-3540-4/6)
TSST1	(Gibco, B1809D03)
TSST2	(Gibco, B1809D04)
ETA1	(Roth, Reg. Nr. 0707B)
ETA2	(Roth, Reg. Nr. 0708B)
ETB1	(Roth, Reg. Nr. 0709B)
ETB2	(Roth, Reg. Nr. 0710B)

### 3.1.6 Enzyme

Lysozym (Merck, 1.05282.0001)  
Taq-Polymerase (5U/ µl) (Promega, M1861)

### 3.1.7 Marker

GeneRuler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas, SM0331)  
DNA Ladder (100bp) (Gibco, 15628-019)

### 3.1.8 Kits

Dneasy Tissue Kit (Qiagen, Cat. No. 69504)  
Sandwich-Enzymimmunoassay Ridascreen-Set A, B, C, D, E  
(R-Biopharm, Art. Nr. R4101)  
Staphaurex-Plus Testsystem (Murex Diagnostics, ZL33/34)

### 3.1.9 Antibiotikatestblättchen

#### β-Lactamantibiotika:

- Penicilline: Penicillin G (10 µg) (Oxoid, CT043B/ X3373)
- Cephalosporine: Cefoperazon ( 30 µg) (Oxoid, CT193B/ X3274)

#### Aminoglykosidantibiotika:

- Gentamicin (10 µg) (Oxoid, CT024B/ X3325)

#### Tetracycline:

- Tetracyclin (30 µg) (Oxoid, CT054B/ X3399)
- Minocyclin (30 µg) (Oxoid, CT030B/ X3345)

#### Makrolide:

- Erythromycin (15 µg) (Oxoid, CT020B/ X3314)

#### Lincosamide:

- Clindamycin (2µg) (Becton Dickinson, S2097)

#### Sulfonamide in Kombination mit Trimethoprim:

- Sulfmethoxazol/ Trimethoprim (SXT, 25µg) (Becton Dickinson,. CT052B/ X3394)

#### Gyrasehemmer:

- Enrofloxacin (5 µg) (Bayer, X3213)

### 3.1.10 Geräte

Gel-Videodokumentationssystem Image Master, VDS (Pharmacia Biotech)

Photometer Sunrise (Tecan)

Thermocycler Personal Cyclor (Biometra)

Thermocycler Techne-Progene (Thermodux)

Zentrifuge Sigma-202MK (Sigma)

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Anzüchtungsmedien

Die Anzüchtung der Kulturen erfolgte auf Schafblutagarplatten, zu deren Herstellung Blutagar-Basis mit folgender Zusammensetzung verwendet wurde:

10,0 g/l	Herzextrakt
10,0 g/l	Tryptose
5,0 g/l	Natriumchlorid
15,0 g/l	Agar
1000 ml	Aqua dest.

Das Medium wurde nach den Angaben des Herstellers angefertigt, 15 min bei 120 °C autoklaviert und auf ca. 50 °C abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 5 % aseptisch entnommenem, defibriniertem Schafblut. Die beimpften Nährböden wurden unter aeroben Bedingungen für 18-24 h bei 37 °C inkubiert.

Die Anzüchtung der Bakterien in flüssigem Medium erfolgte in Hirn-Herz-Glucose-Bouillon. Das Medium setzt sich wie folgt zusammen:

12,5 g/l	Kalbshirninfusion
5,0 g/l	Rinderherzinfusion
10,0 g/l	Proteose-Pepton
2,0 g/l	Glucose
5,0 g/l	Natriumchlorid
2,5 g/l	Dinatriumhydrogenphosphat
1000 ml	Aqua dest.

Das Medium wurde nach den Angaben des Herstellers angefertigt, zu je 40 ml in 250 ml-Erlenmeyerkolben abgefüllt und 15 min bei 121 °C autoklaviert. Die Inkubation der beimpften Kolben erfolgte unter aeroben Bedingungen für 18-24 h bei 37 °C auf einem Rundschüttler.

Zum Nachweis der Eigenschaften Telluritreduktion, Lipolyse und Proteolyse erfolgte die Anzüchtung der Kulturen auf Baird-Parker-Medium (Staphylokokken-Selektivagar nach Baird-Parker) mit folgender Zusammensetzung:

10,0 g/l	Pepton aus Casein
5,0 g/l	Fleischextrakt
1,0 g/l	Hefeextrakt
10,0 g/l	Natriumpyruvat
12,0 g/l	Glycin
5,0 g/l	Lithiumchlorid
1000 ml	Aqua dest.

Das Medium wurde nach den Angaben des Herstellers angefertigt und 15 min bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 50-45 °C erfolgte die Zugabe von 50 ml Eigelb-Tellurit-Emulsion. Staphylokokken wachsen auf diesem Agar, aufgrund einer positiven Telluritreduktion, typischerweise innerhalb von 24-48 h bei 37 °C als kleine, schwarze, glänzende, gewölbte Kolonien mit einem Durchmesser von 1-5 mm. *S. aureus*-Kulturen sind im weiteren bei einer positiven Eigelbreaktion, d.h. bei Lipolyse und Proteolyse, von einem schmalen weißen Ring umgeben.

Zum Nachweis der Eigenschaften Kochsalztoleranz und Abbau von Mannit unter Säurebildung erfolgte die Anzüchtung der Kulturen auf Mannit-Kochsalz-Phenolrot Agar, der sich wie folgt zusammensetzt:

10,0 g/l	Pepton
1,0 g/l	Fleischextrakt
75,0 g/l	Natriumchlorid
10,0 g/l	D(-)-Mannit

0,025 g/l	Phenolrot
12,0 g/l	Agar
1000 ml	Aqua dest.

Das Medium wurde nach den Angaben des Herstellers angefertigt und autoklaviert. Die Eigenschaft der Kochsalztoleranz äußert sich in einem deutlichen Wachstum der Kulturen. Der Abbau von Mannit unter Säurebildung zeigt sich durch einen Farbumschlag des rosa-farbenen Nährbodens nach leuchtend gelb.

### 3.2.2 Hämolyseformen

Zur Beurteilung der Hämolyse und der Koloniemorphologie wurden die Bakterienkulturen auf Schafblutagar (3.2.1) angezüchtet. Die Beurteilung erfolgte nach 24 h Bebrütung bei 37 °C nach folgenden Kriterien:

Eine  **$\alpha$ -Hämolyse** stellt sich als eine breite Zone vollständiger Hämolyse, eine  **$\beta$ -Hämolyse** als eine breite Zone unvollständiger Hämolyse um den Impfstrich dar. Eine  **$\delta$ -Hämolyse** zeigt sich als eine schmale Zone vollständiger Hämolyse um den Impfstrich.

Die unterschiedlichen Hämolyseformen wurden im weiteren nach der von SKALKA et al. (1979) beschriebenen Methode untersucht. Dazu wurde eine nach 3.2.1 hergestellte Schafblutagarplatte strichförmig mit einer  $\beta$ -hämolisierenden *S. aureus*-Kultur (Stamm PERTSCH) beimpft. Senkrecht dazu erfolgte ein strichförmiger, bis ca. 5 mm an die Referenzkultur heranreichender Ausstrich der zu untersuchenden Staphylokokken. Die Beurteilung der Hämolyse erfolgte nach einer Inkubation von 18-24 h bei 37 °C: Eine  **$\alpha$ -Hämolyse** stellt sich als eine im Bereich des *S. aureus*- $\beta$ -Hämolysins gehemmte Zone vollständiger Hämolyse dar. Eine  **$\beta$ -Hämolyse** zeigt sich als eine Zone unvollständiger Hämolyse um den Impfstrich. Eine  **$\delta$ -Hämolyse** zeigt sich als schmale Zone vollständiger Hämolyse und einer halbmondförmigen vollständigen Hämolysezone im Bereich des *S. aureus*- $\beta$ -Hämolysins. Die  **$\delta$ -like-Hämolyse** stellte



sich im Bereich des *S. aureus*- $\beta$ -Hämolysins bei ansonsten fehlender Hämolysen ebenso als halbmondförmige, vollständige Hämolysen dar.

### 3.2.3 Pigmentbildung

Die Pigmentbildung konnte nach der von LÄMMLER et al. (1986) beschriebenen Methode nach Anzüchtung der Bakterien auf Nitrozellulosemembranen beurteilt werden. Hierzu wurde eine Nitrozellulosemembran mit einer sterilen Pinzette auf eine nach 3.2.1 hergestellte Schafblutagarplatte gelegt und strichförmig mit den zu untersuchenden Bakterienkulturen beimpft. Die Beurteilung der Pigmentbildung (weiß, hellgelb, gelb, orange) erfolgte nach einer Inkubation von 18-24 h bei 37 °C.

### 3.2.4 Nachweis der Koagulasereaktion

Der Nachweis der Koagulasereaktion erfolgte mit Hilfe des Röhrchentests nach der von BRÜCKLER et al. (1994) beschriebenen Methode. Zu 250  $\mu$ l zitriertem Kaninchenplasma, gewonnen aus sterilem Zitratblut (1 Vol. 4 % Natriumzitrat zu 9 Vol. Blut), 1:5 mit Natriumchlorid-Lösung (0,14 mol/l) verdünnt, wurden je drei Kolonien der zu untersuchenden Bakterienkulturen sowie *S. aureus* Cowan I (Positivkontrolle) und *S. epidermidis* ATCC 14990 (Negativkontrolle) gegeben. Die Beurteilung erfolgte nach einer Bebrütung von 4 bzw. 24 h bei 37 °C. Eine positive Reaktion lag vor, wenn ein vollständiges oder überwiegend zusammenhängendes Koagulum zu erkennen war.

### 3.2.5 Nachweis des Clumping-Faktors

Der Nachweis des zellgebundenen Clumping-Faktors (CF) erfolgte als Objektträgertest mit zitriertem Kaninchenplasma nach CADNESS-GRAVES et al. (1943). Dazu wurden zwei bis drei Kolonien der nach 3.2.1 angezüchteten Bakterien mittels einer sterilen Öse in einem Tropfen Natriumchlorid-Lösung (0,14 mol/l) auf einem Objektträger suspendiert und dann mit einem Tropfen unverdünntem zitriertem Kaninchenplasma

vermischt. Die Beurteilung der Reaktion erfolgte bei indirekter Beleuchtung mit Hilfe eines Lichtkastens. Eine deutlich erkennbare Agglutination der Bakterien im Plasmatropfen innerhalb von 1-2 min wurde als positive Reaktion gewertet. Als Positivkontrolle diente wiederum *S. aureus* Cowan I, als Negativkontrolle *S. epidermidis* ATCC 14990.

### 3.2.6 Identifizierung mit Hilfe des „Staphaurex-Plus Testsystems“

Eine weitere Differenzierung der Kulturen erfolgte mit Hilfe des „Staphaurex-Plus Testsystems“. Dieser Test dient zum Nachweis der freien Koagulase, des Clumping-Faktors, der Thermonuklease und des Protein A. Dazu wurden auf einem Objektträger zwei bis drei Kolonien der nach 3.2.1 angezüchteten Bakterien in einem Tropfen der Staphaurex-Plus Testsuspension, die mit Fibrinogen und Immunglobulin G beladene Latexpartikel enthält, suspendiert. Die Reaktion wurde bei indirekter Beleuchtung mit Hilfe eines Lichtkastens beurteilt, wobei eine deutlich erkennbare Agglutination der Bakterien innerhalb von 1-2 min als positive Reaktion gewertet wurde. Als Positivkontrolle diente der Stamm *S. aureus* Cowan I, als Negativkontrolle *S. epidermidis* ATCC 14990.

### 3.2.7 Weitere Enzymnachweise

#### 3.2.7.1 DNase und Thermonuklease

Der Nachweis des Enzyms DNase erfolgte mit Hilfe des Fertignährmediums „DNase Testagar“, der sich wie folgt zusammensetzte:

20,0 g	Tryptose
5,0 g	Natriumchlorid
2,0 g	DNA
15,0 g	Agar
1000 ml	Aqua dest.

Nach der Anfertigung des Mediums nach Herstellerangaben und dem Zusatz von 0,1 g Toluidinblau/l erfolgte die Inkubation unter aeroben Bedingungen für 18-24 h bei 37 °C. Bei Vorhandensein von DNase wird die im Nährboden enthaltene DNA hydrolytisch gespaltet und es kommt zu einer metachromatischen Reaktion und Entfärbung des Toluidinblaus und somit zu einer Bildung von leuchtend rosafarbenen Höfen um die Kolonien des ansonsten lauen Nährmediums.

Der Nachweis der hitzestabilen DNase (Thermonuklease) erfolgte wie von LACHICA (1976) beschrieben nach Anzüchtung der Bakterienkulturen auf Caseinpepton-Sojamehlpepton Agar, der sich wie folgt zusammensetzte:

15,0 g	Caseinpepton
5,0 g	Sojamehlpepton
5,0 g	Natriumchlorid
15,0 g	Agar
1000 ml	Aqua dest.

Das Medium wurde nach den Angaben des Herstellers angefertigt und unter aeroben Bedingungen für 18-24 h bei 37 °C inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation für 1 h bei 70 °C folgte die Überschichtung des Nährmediums mit 10 ml durch Erhitzen verflüssigtem Toluidinblau-DNA-Agar und eine erneute Inkubation für 4 h bei 37 °C. Nach Erhitzen im Dampftopf zum Lösen der DNA konnte das Medium anschließend in Röhrchen zu 10 ml abgefüllt und autoklaviert werden. Der Toluidinblau-DNA-Agar setzte sich wie folgt zusammen:

6,05 g	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
0,3 g	DNA
10,0 g	Natriumchlorid
1,0 ml	Calciumchlorid-Lösung (0,01 mol/l)
6,0 ml	Toluidinblau-Lösung (0,1 mol/l)
20,0 g	Agar
1000 ml	Aqua dest.

Nach einer Bebrütung von 24 h bei 37 °C zeigte sich eine positive Reaktion als Bildung von leuchtend rosafarbenen Höfen um die Kolonien des ansonsten blauen Nährmediums.

### 3.2.7.2 Hyaluronidase

Die Überprüfung der Hyaluronidasebildung erfolgte mittels des von WINKLE (1979) beschriebenen Dekapsulationstests. Eine nach 3.2.1 hergestellte Schafblutagarplatte wurde S-förmig mit einer mucoid wachsenden Streptokokkenkultur (*S. equi* subsp. *zooepidemicus* W60) als Indikatorkeim sowie senkrecht dazu mit der zu untersuchenden Bakterienkultur beimpft und für 24 h bei 37 °C bebrütet. Die Bildung des Enzyms Hyaluronidase zeigt sich in nicht-mucoid wachsenden Kolonien der ansonsten mucoid wachsenden Streptokokkenkultur in der Nähe des Staphylokokken-Impfstrichs, da die in den Agar diffundierte Hyaluronidase das mucoide Wachstum der Streptokokken hemmt.

### 3.2.8 Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten

Zur Überprüfung der Antibiotikaempfindlichkeit der Kulturen kam das vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV, Berlin, Stand 2/2000) empfohlene Verfahren zur Anwendung. Hierfür wurden drei bis fünf Kolonien der zu untersuchenden Kulturen in je 3 ml nach 3.2.1 hergestelltem BHI-Medium inokuliert und für 2 h bei 37 °C bebrütet. Nach Ausspateln von 0,1 ml der Bakteriensuspension auf Müller-Hinton Agar mit Blutzusatz erfolgte das Auflegen der Antibiotikatestblättchen. Der Müller-Hinton Agar hatte folgende Zusammensetzung:

5,0 g	Fleischinfusion
17,5 g	Caseinhydrolysat
1,5 g	Stärke
12,5 g	Agar

1000 ml            Aqua dest.

50 ml             aseptisch entnommenes, defibriniertes Schafblut

Das Nährmedium wurde nach den Angaben des Herstellers gefertigt und 15 min bei 121 °C autoklaviert. Das Schafblut konnte nach dem Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C hinzugegeben werden. Eine Bewertung der in mm gemessenen Größen der Hemmhöfe erfolgte wie in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1:

Übersicht über die verwendeten Antibiotikatestblättchen sowie die nach den Angaben der BgVV erfolgte Bewertung der gemessenen Hemmhöfe

Antibiotikum	Bezeichnung/ Beladung in µg	Bewertung (Hemmhof in mm)		
		Sensibel	Intermediär	Resistent
Penicillin	P10 / 10	≥ 29	-	≤28
Cefoperazon	CFP / 30	≥ 17	16-11	≤ 10
Gentamicin	GM10 / 10	≥ 21	20-15	≤14
Tetracyclin	TE30 / 30	≥ 22	21-17	≤16
Minocyclin	MH / 30	≥ 19	18-15	≤14
Erythromycin	E15 / 15	≥ 21	20-17	≤16
Clindamycin	CC5 / 2	≥ 17	16-15	≤14
Sulfamethoxazol/ Trimethoprim	SXT25 / 25	≥ 16	15-11	≤10
Enrofloxacin	ENR5/ 5	≥17	16-15	≤14

### **3.3 Nachweis von *S.aureus*-spezifischen Genabschnitten und von Toxingenen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)**

#### **3.3.1 DNA-Präparation mit dem „Quiagen Tissue Kit“**

Zur Präparation der bakteriellen DNA wurde das DNeasy Tissue Kit der Firma Qiagen verwendet: Die Anzucht der Kulturen erfolgte in BHI-Medium (3.2.1) für 24 h bei 37 °C auf einem Rundschüttler. Je 1 ml des bebrüteten Nährmediums wurde in sterile Reaktionsgefäße gegeben und für 10 min bei 6000 x g zentrifugiert. Das entstehende Sediment wurde zur Zellwandlyse mit 180 µl TE-Puffer und 3 µl Lysostaphin versetzt und anschließend für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl Proteinase K und 200 µl AL-Puffer zur Deproteinisierung und gründlicher Durchmischung des Reaktionsgemischs erfolgte eine weitere Inkubation für 2 h bei 56 °C im Wasserbad. Zur Inaktivierung der Proteinase K erfolgte anschließend eine Erhitzung des Reaktionsgemischs für 10 min auf 100 °C. Nach einer kurzen Abkühlphase und der Zugabe von 200 µl Ethanol (96 %) wurde das Reaktionsgemisch durch den DNeasy Filtereinsatz mit Silicamembran mittels Zentrifugation für 1 min bei 6000 x g in ein 2 ml-Reaktionsgefäß abfiltriert. Die an die Membran gebundene DNA wurde danach 2 x mit je 500 µl AW-Puffer gewaschen und dann zunächst bei 6000 x g für 1 min, bzw. nach dem zweiten Waschen für 3 min zum Trocknen der Silicamembran zentrifugiert. Der jeweilige Überstand wurde verworfen und der DNeasy Filtereinsatz mit Silicamembran in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß verbracht. Das Eluieren der an die Membran gebundenen DNA erfolgte mittels 200 µl AE-Puffer und anschließender Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Das DNA-haltige Eluat wurde bei 6000 x g abzentrifugiert und der Elutionsschritt mit 100 µl AE-Puffer zur Gewinnung weiterer DNA wiederholt. Die so erhaltene DNA wurde direkt in die PCR eingesetzt oder bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.3.2 Durchführung der PCR

Zur Durchführung der PCR erfolgte die Erstellung eines Mastermix mit folgender Zusammensetzung je Reaktionsansatz:

1,0 µl	Primer 1 (10 pmol)
1,0 µl	Primer 2 (10 pmol)
0,6 µl	dNTP (10 mmolar)
3,0 µl	Inkubationspuffer (10fach)
1,8 µl	Magnesiumchlorid (25 mmol/l)
0,1 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
20,0 µl	Aqua bidest.

Nach gründlicher Durchmischung des Mastermixes wurden 27,5 µl in ein 500 µl Reaktionsgefäß überführt und mit je 2,5 µl der nach 3.3.1 präparierten DNA vermischt.

### 3.3.3 Oligonukleotidprimer und Thermocycler-Temperaturprogramme

Die verwendeten Oligonukleotidprimer einschließlich ihrer Erstbeschreibung sind in Tabelle 2 dargestellt. Im Thermocycler erfolgte zunächst jeweils eine initiale Denaturierung der DNA für 4 min bei 94 °C mit anschließenden sich unterschiedlich oft wiederholenden Zyklen zur Denaturierung, Primeranlagerung und Polymerisierung (Temperaturprogramme siehe Tabelle 3). Den Abschluß bildete ein 4 min Extensionszyklus bei 72 °C, wonach die Proben bis zum Auftragen in ein Gel bei +4 °C aufbewahrt wurden.

Tabelle 2:  
Übersicht über die verwendeten Oligonukleotidprimer

<b><u>Zielgen</u></b>	<b><u>Primer- name</u></b>	<b><u>Primersequenz (5'-3')</u></b>	<b><u>Referenz</u></b>
23S rDNA	Staur4 Staur6	ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	STRAUB et al. (1999)
16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region	STAA-AUI STAA-AUII	TCT TCA GAA GAT GCG GAA TA TAA GTC AAA CGT TAA CAT ACG	FORSMAN et al. (1997)
<i>S. aureus</i> „Genom“	Sa442-1 Sa442-2	AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA	MARTINEAU et al. (1998)
<i>clfA</i>	clfAI clfAII	GGC TTC AGT GCT TGT AGG TTT TCA GGG TCA ATA TAA GC	McDEVITT et al. (1994)
<i>nuc</i>	nucAI nucAII	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	BRAKSTAD et al. (1992)
<i>coa</i>	coaI coaII	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	HOOKEY et al. (1998)
<i>spa</i> (X-Region)	spaIII spaIV	CAA GCA CCA AAA GAG GAA CAC CAG GTT TAA CGA CAT	FRÉNAVY et al. (1996)
<i>sea</i>	SEA1 SEA2	AAA GTC CCG ATC AAT TTA TGG CTA GTA ATT AAC CGA AGG TTC TGT AGA	TSEN und CHEN (1992)
<i>seb</i>	SEB1 SEB2	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC	JOHNSON et al. (1991)
<i>sec</i>	SEC1 SEC2	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	JOHNSON et al. (1991)
<i>sed</i>	SED1 SED2	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG	JOHNSON et al. (1991)
<i>see</i>	SEE1 SEE2	TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	JOHNSON et al. (1991)
<i>seg</i>	SEG1 SEG2	AAT TAT GTG AAT GCT CAA CCC GAT C AAA CTT ATA TGG AAC AAA AGG TAC TAG TTC	JARRAUD et al. (1999)
<i>seh</i>	SEH1 SEH2	CAA TCA CAT CAT ATG CGA AAG CAG CAT CTA CCC AAA CAT TAC CAC C	JARRAUD et al. (1999)
<i>sei</i>	SEI1 SEI2	CTC AAG GTG ATA TTG GTG TAG G AAA AAA CTT ACA GGC AGT CCA TCT C	JARRAUD et al. (1999)
<i>sej</i>	SEJ1 SEJ2	CAT CAG AAC TGT TGT TCC GCT AG CTG AAT TTT ACC ATC AAA GGT AC	MONDAY und BOHACH (1999a)
<i>tst</i>	TSST1 TSST2	ATG GCA GCA TCA GCT TGA TA TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT	JOHNSON et al. (1991)
<i>eta</i>	ETA1 ETA2	CTA GTG CAT TTG TTA TTC AA TGC ATT GAC ACC ATA GTA CT	JOHNSON et al. (1991)
<i>etb</i>	ETB1 ETB2	ACG GCT ATA TAC ATT CAA TT TCC ATC GAT AAT ATA CCT AA	JOHNSON et al. (1991)



Tabelle 3:  
Übersicht über die verwendeten Thermocycler-Temperaturprogramme

<u>Zielgen</u>	<u>Primername</u>	<u>Temperaturprogramm</u>
23S-rDNA	STAUR4 STAUR6	30 Zyklen 94 °C 60 s; 57 °C 60 s; 72 °C 60 s
16S-23S rDNA „intergenic spacer“- Region	STAA-AUI STAA-AUII	30 Zyklen 94 °C 30 s; 55 °C 30 s; 72 °C 90 s
<i>S. aureus</i> „Genom“	Sa442-1 Sa442-2	30 Zyklen 95°C 10s; 55°C 30s; 72°C 30 s
<i>clfA</i>	ClfAI ClfAII	30 Zyklen 94 °C 60 s; 57 °C 60 s; 72 °C 60 s
<i>nuc</i>	NucAI NucAII	30 Zyklen 94°C 60s; 55°C 30s; 72°C 90 s
<i>coa</i>	CoaI CoaII	30 Zyklen 94 °C 60 s; 58 °C 60 s; 72 °C 60 s
<i>spa</i> (X-Region)	SpaIII SpaIV	30 Zyklen 94° C 60 s; 64 °C 60 s; 72 °C 60 s
<i>sea</i>	SEA1 SEA2	30 Zyklen 94 °C 120 s; 55 °C 120 s; 72 °C 60 s
<i>seb</i>	SEB1 SEB2	
<i>sec</i>	SEC1 SEC2	
<i>sed</i>	SED1 SED2	
<i>see</i>	SEE1 SEE2	
<i>seg</i>	SEG1 SEG2	
<i>seh</i>	SEH1 SEH2	
<i>sei</i>	SEI1 SEI2	
<i>sej</i>	SEJ1 SEJ2	30 Zyklen 94 °C 60 s; 62 °C 60 s; 72 °C 60 s
<i>tst</i>	TSST1 TSST2	30 Zyklen 94 °C 120 s; 55 °C 120 s; 72 °C 60 s
<i>eta</i>	ETA1 ETA2	
<i>etb</i>	ETB1 ETB2	

### **3.3.4 Agarosegelelektrophorese**

Der Nachweis der Amplikons erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese in einem Agarosegel (2 %). Dazu wurden zunächst 2,4 g Agarose NEE0 in 120 ml TAE-Puffer (3.1.2) unter Erhitzen gelöst und in eine Flachbettform gegossen. Nach dem Abkühlen konnte nun je 12 µl des PCR-Produktes mit 3 µl „Loading-Dye“ vermischt und in das erstarrte Agarosegel pipetiert werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im Horizontalgel für 2,5 h bei 120 mA, wobei als Laufpuffer ebenfalls TAE-Puffer diente. Eine Bestimmung der Größe der PCR-Produkte ermöglichte ein ebenfalls in das Gel aufgetragener Marker.

### **3.3.5 Ethidiumbromidfärbung**

Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Darstellung der DNA Fragmente durch Färbung des Gels für 5 min in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (5 U/ µl) wobei sich das fluoreszierende Ethidiumbromid als interkalierende Substanz in die Doppelstränge der DNA einlagert. Überschüssiges Ethidiumbromid wurde durch 20 minütiges Schwenken in Aqua dest. bei Raumtemperatur entfernt. Die Auswertung und photographische Dokumentation erfolgte anschließend unter UV-Licht mit Hilfe eines Gel-Videodokumentationssystem, wobei sich die DNA Fragmente als helle Banden vor dunklem Hintergrund darstellten.

## **3.4 Nachweis der Staphylokokken Enterotoxine A, B, C, D und E**

Der Nachweis der Staphylokokkenenterotoxine SEA, SEB, SEC, SED und SEE erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Sandwich-Enzymimmunoassays (EIA). Hierzu erfolgte die Anzuchtung der Bakterien in nach 3.2.1 hergestelltem flüssigem BHI-Medium. Der kommerzielle EIA wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Zur Bestimmung der pro Ansatz enthaltenen Staphylokokken diente die Keimzahlbestimmung mittels Tropfplattenverfahren (nach der amtlichen Methode L 06.00-18, LMBG §35). Es wurde von den 24 h in BHI bebrüteten Kulturen jeweils eine Verdünnungsreihe angefertigt und je 0,05 ml der Verdünnungsstufen  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  und  $10^{-9}$  im Doppelansatz auf einen Nährboden aufgetropft, welcher in mehrere Sektoren unterteilt wurde. Die Verdünnungslösung bestand aus:

0,1 g	Pepton
8,5 g	Natriumchlorid
0,75 g	Agar nichtselektiven
1000 ml	Aqua dest.

Anschließend erfolgte die Bebrütung der Platten für 72 h bei 30 °C.

Zur Auszählung wurden diejenigen Sektoren der Platten verwendet, auf denen zwischen 1 bis maximal 50 Kolonien gewachsen waren sowie die nächst höhere Verdünnungsstufe. Aus den gezählten Kolonien wurde der gewichtete Mittelwert mittels folgender Formel errechnet:

$$X = \frac{\Sigma}{n^1 \times 1 + n^2 \times 0,1}$$

X : gewichteter Mittelwert der Koloniezahlen

Σ: Summe der Kolonien der niedrigsten und nächst höheren auswertbaren Verdünnungsstufe

$n^1$ : Anzahl der Sektoren der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe

$n^2$ : Anzahl der Sektoren der nächsthöheren Verdünnungsstufe

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Phänotypische Eigenschaften

Bei allen 47 untersuchten *S. aureus*-Kulturen, isoliert von Schafen (n=42) und von Ziegen (n=5), handelte es sich um grampositive, unregelmäßig angeordnete, katalasepositive Kokken, die sowohl auf Schafblutagar als auch auf Staphylokokken-Selektivnährmedien (3.2.1) wuchsen. Auf dem Staphylokokken-Selektivmedium nach Baird-Parker bildeten alle Isolate, aufgrund einer positiven Telluritreduktion, schwarze, glänzende, gewölbte Kolonien mit einem Durchmesser von 1-5 mm. Die Kolonien von vier Kulturen, drei isoliert von Schafen und eine von einer Ziege, waren von einem klaren Hof umgeben, was auf das Proteolyse- und Lipolysevermögen der Kulturen hindeutete. Desweiteren wurden die Eigenschaften Kochsalztoleranz und Mannitvergärung mit Hilfe des Mannit-Kochsalz-Phenolrot Agars überprüft. Alle 47 Kolonien wuchsen auf diesem Nährboden in Gegenwart von 7,5 % Natriumchlorid, wobei sich der Abbau von Mannit unter Säurebildung durch eine deutliche Gelbfärbung des Anzüchtungsmediums zeigte. Alle 47 untersuchten Isolate erwiesen sich dabei als mannitpositiv.

Die Beurteilung der Hämolyseformen der 47 Staphylokokkenisolate erfolgte zunächst nach Anzüchtung der Isolate auf Schafblutagarplatten (3.2.1). Hierbei war bei 23 Schaf- und allen fünf Ziegenisolaten eine  $\alpha$ -Hämolyse nachweisbar. Bei 13 Isolaten vom Schaf war eine  $\beta$ -Hämolyse zu erkennen. Zwei der Isolate vom Schaf wiesen eine  $\delta$ -Hämolyse auf, vier der untersuchten Isolate zeigten keine Hämolyse. Eine weitere Untersuchung der Isolate erfolgte wie unter 3.2.2 beschrieben. Hierbei führten die zwei zuvor genannten Isolate vom Schaf mit  $\delta$ -Hämolyse zu einer CAMP-ähnlichen Verbreiterung der Hämolyse im Bereich des *S. aureus*- $\beta$ -Hämolysins. Zwei der vier auf Schafblutagar ohne Hämolyse wachsenden Isolate vom Schaf zeigten eine  $\delta$ -like-Hämolyse, bei zwei weiteren Isolaten vom Schaf war sowohl nach Kultivierung auf Schafblutagar als auch nach der unter 3.2.2 beschriebenen Methode keine Hämolyse festzustellen. Die Verteilung der unterschiedlichen Hämolyseformen der Schaf- und Ziegenisolate ist in Tabelle 4 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4:  
Verteilung der Hämolyseformen bei den von Schafen (n=42) und Ziegen (n=5) isolierten *S. aureus*-Kulturen.

Anzahl der Kulturen		Hämolyse
Schaf	Ziege	
23	5	$\alpha$
13	-	$\beta$
2	-	$\delta$
2	-	$\delta$ -like
2	-	keine

Die Bildung von Pigment wurde nach Anzüchtung der Bakterien auf Nitrozellulosemembranen (3.2.3) beurteilt. Dabei zeigten vier der untersuchten *S. aureus*-Isolate vom Schaf und drei *S. aureus*-Isolate von der Ziege die Bildung eines orange farbenen Pigments. Die Mehrzahl der untersuchten Isolate (30 Isolate vom Schaf und ein Isolat von der Ziege) wuchsen als gelbe Kolonien. Fünf Schafkulturen zeigten ein hellgelbes Pigment, drei Isolate vom Schaf und ein Isolat von der Ziege wuchsen als weiße, unpigmentierte Kolonien (Tabelle 5).

Tabelle 5:  
Pigmentbildung der 47 untersuchten Schaf- und Ziegenisolate nach Anzüchtung auf Nitrozellulosemembranen.

Anzahl der Kulturen		Pigmentierung
Schaf	Ziege	
4	3	orange
30	1	gelb
5	-	hellgelb
3	1	weiß

Zur weiteren Charakterisierung der Isolate wurde die Koagulaseaktivität im Röhrchentest (3.2.4) untersucht. Dabei zeigten alle 47 untersuchten *S. aureus*-Isolate innerhalb von 24 h eine Koagulation des Plasmas und somit eine positive Reaktion. Der Nachweis des zellgebundenen Clumping-Faktors erfolgte nach 3.2.5 als Objektträger test mit zitriertem Kaninchenplasma. Alle 47 Isolate erwiesen sich als Clumping-Faktor-positiv. Das Staphaurex Plus Testkit (3.2.6) diente zur weiteren Differenzierung der *S. aureus*-Isolate. Alle 47 Isolate ergaben einen positiven Nachweis von *S. aureus*.

Mit dem nach 3.2.7.1 beschriebenen DNase-Testagar war der Nachweis des Enzyms DNase und nach Erhitzung des Anzüchtungsmediums der Nachweis der Staphylokokkenthernuklease möglich. Alle 47 untersuchten Kulturen erwiesen sich als positiv, was sich als Rosafärbung um die Kolonien des ansonsten blauen Nährmediums zeigte. Desweiteren war das Enzym Hyaluronidase (3.2.7.2) bei allen 47 Kulturen nachweisbar.

Bei der Untersuchung der Antibiotikaempfindlichkeiten (3.2.8) reagierten alle 47 untersuchten Kulturen empfindlich gegenüber Erythromycin, Minocyclin, Sulfmethoxazol/Trimethoprim und Tetracyclin. Die Empfindlichkeiten gegenüber den übrigen getesteten Antibiotika erwiesen sich als variabel, wobei ein Isolat vom Schaf gegenüber Clindamycin, ein weiteres Isolat vom Schaf gegenüber Enrofloxacin und fünf Isolate vom Schaf sowie zwei Ziegenisolate gegenüber Penicillin G resistent waren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6:  
Antibiotikaempfindlichkeiten der 47 untersuchten *S. aureus*-Kulturen

Antibiotikum	resistent		intermediär		Sensibel	
	Schaf	Ziege	Schaf	Ziege	Schaf	Ziege
Cefoperazon	~*	-	1	-	41	5
Clindamycin	1	-	-	-	41	5
Enrofloxacin	1	-	1	-	40	5
Erythromycin	-	-	-	-	42	5
Gentamicin	-	-	20	3	22	2
Minocyclin	-	-	-	-	42	5
Penicillin G	5	2	-	-	37	3
Sulfmethoxazol/ Trimethoprim	-	-	-	-	42	5
Tetracyclin	-	-	-	-	42	5

\*: Anzahl der Kulturen

## 4.2 Nachweis von speziesspezifischen Genabschnitten

Eine weitergehende Identifizierung und Charakterisierung der untersuchten Kulturen erfolgte durch PCR-vermittelte Nachweise speziesspezifischer Genabschnitte (3.3). Bei allen untersuchten *S. aureus*-Kulturen konnte das 23S rRNA-Gen, die 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region, ein mit Sa442 bezeichneter *S. aureus*-spezifischer Genabschnitt innerhalb der chromosomalen DNA, das den Clumping-Faktor-kodierende Gen *clfA*, das Thermonuklease-Gen *nuc*, das Koagulase-Gen *coa* und den die X-Region kodierenden Teil des Protein A-Gens *spa* nachgewiesen werden.

Die Amplifizierung eines *S. aureus*-spezifischen Abschnitts des 23S rRNA-Gens mit den unter 3.3.3 beschriebenen Oligonukleotidprimern ergab für alle 47 untersuchten Kulturen ein Amplikon mit einer einheitlichen Größe von 1.250 Basenpaaren (Abb. 3).

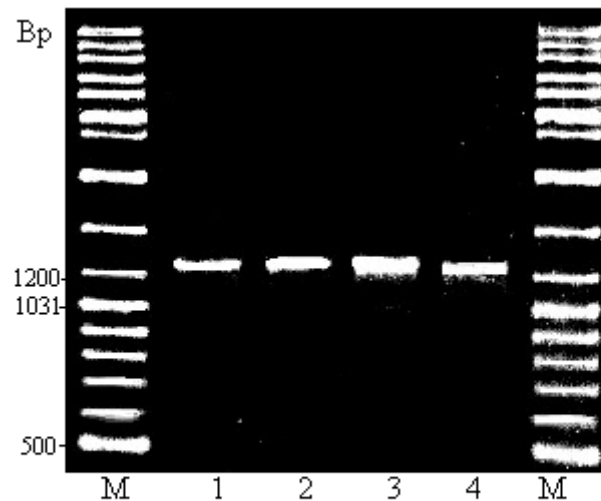


Abb. 3:

Typisches Amplikon des 23S rRNA-Gens von vier *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von 1.250 Bp.  
M=Marker (Gene Ruler, MBI Fermentas)



Bei der Amplifizierung eines *S. aureus*-spezifischen Bereichs der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region mit den unter 3.3.3 beschriebenen Oligonukleotidprimern war bei allen 47 Kulturen ein Amplikon nachweisbar. Die Amplikons zeigten Größenpolymorphismen. Dabei war bei 17 Isolaten vom Schaf ein Amplikon mit einer Größe von 400 Bp und bei 22 Isolaten vom Schaf sowie bei allen fünf Ziegenisolaten ein Amplikon mit einer Größe von 430 Bp nachweisbar. Bei drei Isolaten vom Schaf konnte ein 460 Bp großes Amplikon festgestellt werden (Abb. 4).

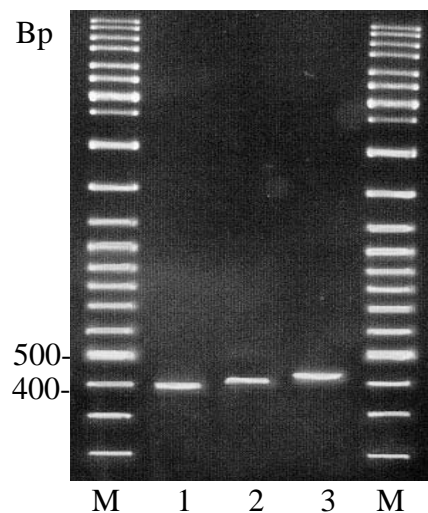


Abb. 4:  
Amplikon der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region von drei *S. aureus*-Kulturen mit Größen von 400 Bp (1), 430 Bp (2) und 460 Bp (3). M siehe Abb. 3.

Nach Amplifizierung eines *S. aureus*-spezifischen Genabschnitts innerhalb der chromosomalen DNA (Sa442) mit den unter 3.3.3 beschriebenen Oligonukleotidprimern war bei allen 47 untersuchten Kulturen ein einheitliches Amplikon mit einer Größe von 110 Bp nachweisbar (Abb. 5).

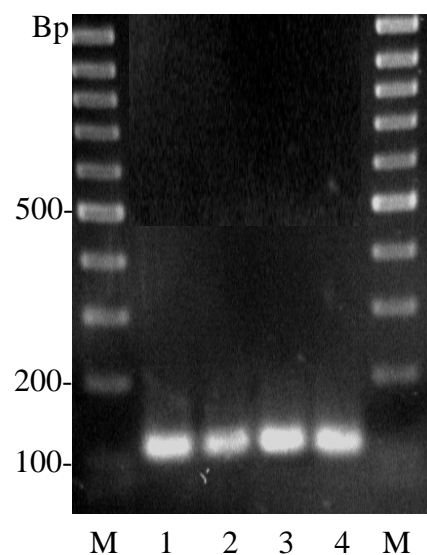


Abb. 5:  
Typisches Amplikon des *S. aureus*-spezifischen Abschnitts Sa442 innerhalb der chromosomalen DNA von vier *S. aureus*-Kulturen, mit einer Größe von 110 Bp. M siehe Abb. 3.

Die Amplifizierung des Clumping-Faktor-Gens *clfA* mit den unter 3.3.3 beschriebenen Oligonukleotidprimern ergab bei allen 47 untersuchten Kulturen ein Amplikon mit einer einheitlichen Größe von 980 Bp (Abb. 6).

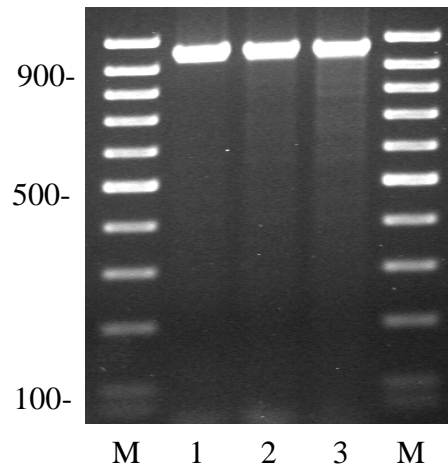


Abb. 6:  
Typisches Amplikon des *clfA*-Gens von drei *S. aureus*- Kulturen mit einer Größe von 980 Bp. M siehe Abb. 3.

Im weiteren erfolgte die Amplifizierung des *S. aureus*-Thermonuklease-Gens *nuc* (3.3.3). Dies ergab bei allen 47 untersuchten Kulturen ein Amplikon mit einer einheitlichen Größe von 280 Bp (Abb. 7).

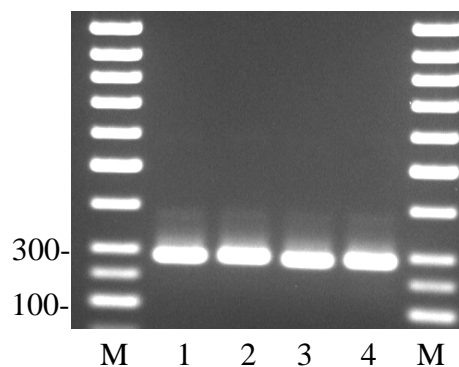


Abb. 7:  
Typisches Amplikon des *nuc*-Gens von vier *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von 280 Bp. M siehe Abb. 3.

Bei allen 47 *S. aureus*-Isolaten der vorliegenden Untersuchung war ferner nach 3.3.3 eine Amplifizierung des Koagulase-Gens möglich. Hierbei traten Größenpolymorphismen auf.

Nach Untersuchungen von KAIDA et al. (1989) und KAWABATA et al. (1986) kodiert das Koagulase-Gen einen die prothrombinbindende Region beinhaltenden und als Chymotryptic-43 kDa-Fragment bezeichneten Abschnitt. Der das C-terminale Ende der Koagulase kodierende Genabschnitt beinhaltet einen 330 Bp großen konstanten Anteil (K) sowie einige sich wiederholende Einheiten („Repeats“) mit einer Größe von jeweils 81 Bp (R). Die Abbildung 8 zeigt schematisch den Aufbau des Koagulase-Gens und die Ansatzstellen der Oligonukleotidprimer *coa1* und *coa2*. Der mit diesen Primern amplifizierte konstante Anteil des *coa*-Gens betrug 195 Bp. Bei der Amplifizierung des *coa*-Gens war bei zwei *S. aureus*-Isolaten vom Schaf ein Amplikon mit einer Größe von 370 Bp und entsprechend zwei „Repeats“, bei sieben Schafisolaten und einem Isolat von der Ziege ein Amplikon mit einer Größe von 560 Bp und entsprechend vier „Repeats“ nachweisbar. Ein Amplikon mit einer Größe von 640 Bp und somit fünf „Repeats“ wiesen sechs Isolate vom Schaf und ein Isolat von der Ziege auf. Bei drei Schafisolaten und einem Isolat von der Ziege konnte ein Amplikon mit einer Größe von 720 Bp und entsprechend sechs „Repeats“, bei 24 Schaf- und zwei Ziegenisolaten ein Amplikon mit einer Größe von 800 Bp, entsprechend sieben „Repeats“ nachgewiesen werden (Abb. 9). Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammenfassend dargestellt.

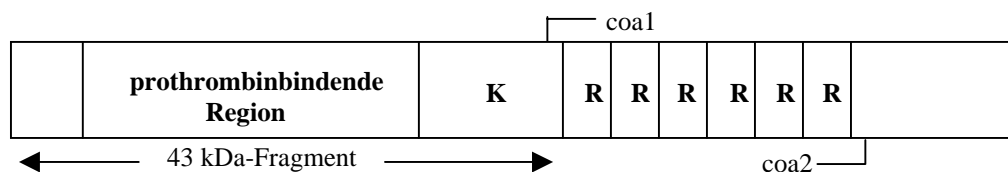


Abb. 8:

Schematische Darstellung des Koagulase-Gens von *S. aureus* nach Angaben von KAWABATA et al. (1986) und KAIDA et al. (1989) sowie der Ansatzstellen der Oligonukleotidprimer. Der Buchstabe K bezeichnet den konstanten Anteil, der Buchstabe R die sich wiederholenden Einheiten („Repeats“) des *coa*-Gens.

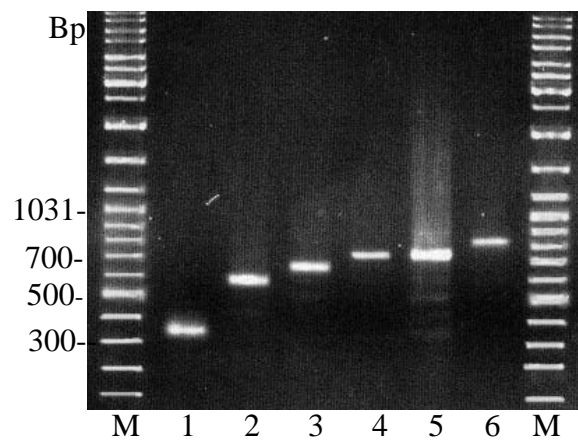


Abb. 9:

Amplikons des *coa*-Gens von sechs *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von 370 Bp, entsprechend zwei „Repeats“ (1), 560 Bp, entsprechend vier „Repeats“ (2), 640 Bp, entsprechend fünf „Repeats“ (3), 720 Bp, entsprechend sechs „Repeats“ (4, 5) und 800 Bp, entsprechend sieben „Repeats“ (6). M siehe Abb. 3.

Tabelle 7:

Größe der Amplikons des Koagulase-Gens der 47 untersuchten *S. aureus*-Kulturen, sowie Anzahl der „Repeats“

Anzahl der Kulturen		Größe des Amplikons (Bp)	Anzahl der „Repeats“
Schaf	Ziege		
2*	-	370	2
7	1	560	4
6	1	640	5
3	1	720	6
24	2	800	7

\*: Anzahl der Kulturen

In weitergehenden Untersuchungen konnten bei allen 47 Kulturen der vorliegenden Untersuchungen der die X-Region des Protein A kodierende Genabschnitt (nach 3.3.3) nachgewiesen werden. Dieser Genabschnitt zeigte ebenfalls Genpolymorphismen.

Nach UHLÉN et al. (1984) kodiert das Protein A-Gen eine Signalsequenz (S), fünf IgG-bindende Einheiten (1-5) sowie die zellwandassoziierte X-Region. Der die X-Region kodierende Genabschnitt besteht aus einem repetitiven Anteil (Xr) mit je 24 Bp großen Einheiten („Repeats“) und einem funktionell als Membrananker bezeichneten, konstanten Anteil am C-terminalen Ende (Xc). Die Abbildung 10 zeigt schematisch den Aufbau des *spa*-Gens und die Ansatzstellen der Oligonukleotidprimer *spa*III und *spa*IV. Der mit diesen Primern amplifizierte konstante Anteil des *spa*-Gens betrug 28 Bp. Bei der Amplifizierung des die X-Region kodierenden Genabschnitts wiesen fünf der untersuchten Isolate vom Schaf ein Amplikon mit einer Größe von 100 Bp, entsprechend drei „Repeats“ und zwei Isolate vom Schaf- sowie ein Isolat von der Ziege ein Amplikon mit einer Größe von 220 Bp, entsprechend acht „Repeats“ auf. Die Mehrzahl der Isolate d.h. 21 Schaf- und drei Ziegenisolate besaßen ein Amplikon mit einer Größe von 290 Bp, entsprechend elf „Repeats“. Sechs Isolate vom Schaf besaßen ein Amplikon mit einer Größe von 320 Bp, entsprechend zwölf „Repeats“. Im weiteren konnten bei sieben Isolaten von Schaf und einem Isolat von der Ziege ein Amplikon mit einer Größe von 350 Bp, entsprechend 13 „Repeats“ festgestellt werden. Bei einem Isolat vom Schaf war ein Amplikon mit einer Größe von 440 Bp, entsprechend 17 „Repeats“ nachweisbar (Abb. 11). Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

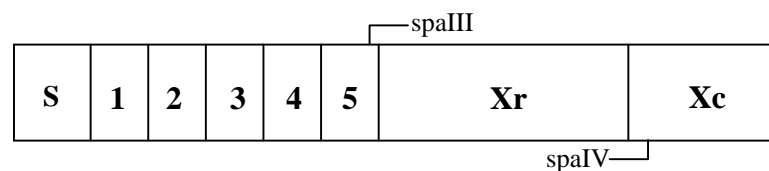


Abb. 10:

Schematische Darstellung des *spa*-Gens nach UHLÉN et al. (1984) und die Ansatzstellen der Oligonukleotidprimer. Der Buchstabe S bezeichnet den die Signalsequenz kodierenden Teil, Xr den repetitiven Anteil und Xc den konstanten Anteil des *spa*-Gens. Die die fünf IgG-bindenden Einheiten kodierende Anteile des *spa*-Gens sind mit 1-5 gekennzeichnet.

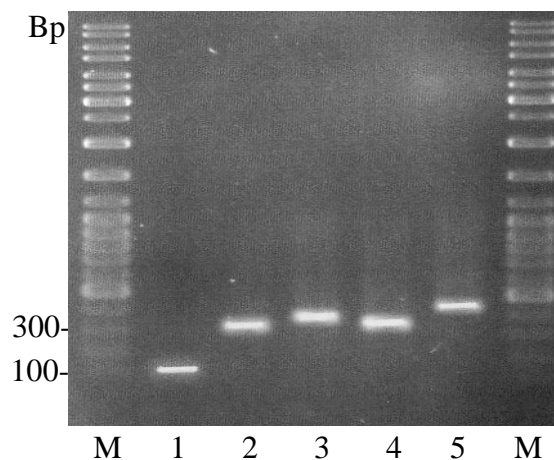


Abb. 11:

Amplikons des die X-Region des Protein A kodierenden Genabschnitts von fünf *S. aureus*-Kulturen mit Größen von 100 Bp und entsprechend drei „Repeats“ (1), 290 Bp entsprechend elf „Repeats“ (2, 4), 350 Bp entsprechend 13 „Repeats“ (3) und 440 Bp mit entsprechend 17 „Repeats“ (5). M siehe Abb. 3.

Tabelle 8:

Amplikongrößen des die X-Region des Protein A kodierenden Genabschnitts der 47 untersuchten *S. aureus*-Kulturen, sowie Anzahl der „Repeats“

Schaf	Ziege	Größe des Amplikons (Bp)	Anzahl der „Repeats“
5*	-	100	3
2	1	220	8
21	3	290	11
6	-	320	12
7	1	350	13
1	-	440	17

\* : Anzahl der Kulturen

### 4.3 Nachweis von Enterotoxinen und deren Toxingene

Der Nachweis der für die Toxinbildung verantwortlichen Genabschnitte erfolgte ebenfalls mittels PCR (3.3); dies jeweils nach Amplifizierung mit den unter 3.3.3 beschriebenen Oligonukleotidprimern und Thermocycler-Temperaturprogrammen. Innerhalb der 47 untersuchten *S. aureus*-Isolate konnte bei 36 Isolaten vom Schaf (77 %) und vier Isolaten von der Ziege (80 %) das Gen für ein oder mehrere Staphylokokkenenterotoxine nachgewiesen werden. Bei zwei Isolaten vom Schaf war das Gen *sec* mit einer Größe von 240 Bp (Abb. 12), bei zwei weiteren Isolaten vom Schaf und einem Isolat von der Ziege das Gen *seg* mit einer Größe von 640 Bp (Abb. 13), bei einem Schafisolat das Gen *sei* mit einer Größe von 570 Bp (Abb. 14) und bei einem weiteren Isolat vom Schaf das Gen *tst* mit einer Größe von 350 Bp (Abb. 15) nachweisbar. Bei insgesamt 25 Isolaten, davon 22 vom Schaf und drei von der Ziege, war sowohl das Gen *sec* als auch das Gen *tst* nachweisbar. Das gemeinsame Auftreten von *seg* und *tst* war bei einem Isolat vom Schaf, das gemeinsame Auftreten von *sec* und *seg* bei zwei Isolaten vom Schaf und das gemeinsame Auftreten von *sec* und *sei* bei drei Isolaten vom Schaf feststellbar. Bei je einem Schafisolat waren die Gene *tst*, *sec* und *seg* bzw. *tst*, *sec* und *sei* feststellbar. Bei keinem der untersuchten *S. aureus* konnten die Gene *sea*, *seb*, *sed*, *see*, *seh*, *sej* sowie *eta* und *etb* nachgewiesen werden.

Der Nachweis des Toxinbildungsvermögens (Enterotoxin A-E) der *S. aureus*-Kulturen erfolgte mittels des unter 3.4 beschriebenen ELISA Sandwich-Enzymimmunoassays. Mit diesem Nachweisverfahren konnte bei 28 Isolaten vom Schaf und einem Isolat von der Ziege das Enterotoxin C und bei einem Schaf- und einem Ziegenisolat die Bildung des Enterotoxins A nachgewiesen werden. Bei keinem der Isolate waren die Enterotoxine B, D und E vorhanden. Für das Schaf- bzw. das Ziegenisolat, bei denen mittels ELISA eine Bildung des Enterotoxins SEA nachgewiesen werden konnte, war jedoch der entsprechende *sea*-Gennachweis mittels PCR nicht möglich. Bei drei Schafisolaten und zwei Ziegenisolaten, die das Gen *sec* aufwiesen, konnte mittels ELISA keine Toxinbildung nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zum Toxinbildungsvermögen sowie zum Nachweis der Toxingene sind in den Tabellen 9 und 10 zusammenfassend dargestellt.



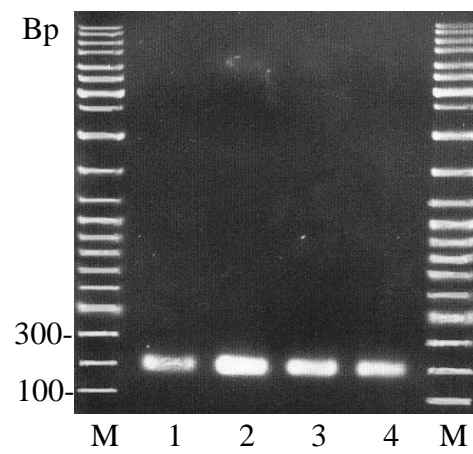


Abb. 12:  
Typische Amplikons des Gens *sec* von vier *S. aureus*-Isolaten mit einer Größe von 240 Bp. M siehe Abb. 3.

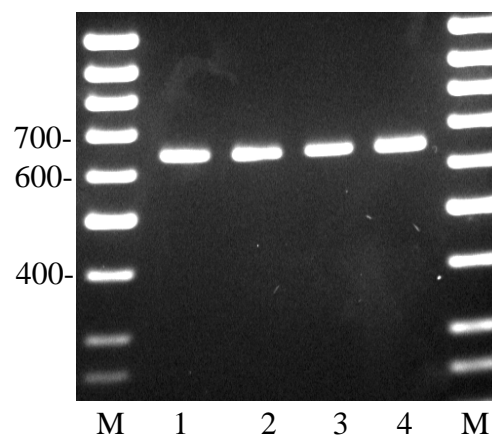


Abb. 13:  
Amplikons des Gens *seg* von vier *S. aureus*-Isolaten mit einer Größe von 640 Bp. M siehe Abb. 3.

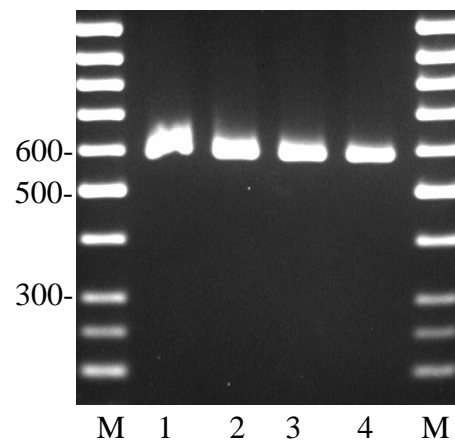


Abb. 14:  
Amplikons des Gens *sei* von vier *S. aureus*-Isolaten mit einer Größe von 580 Bp. M siehe Abb. 3.

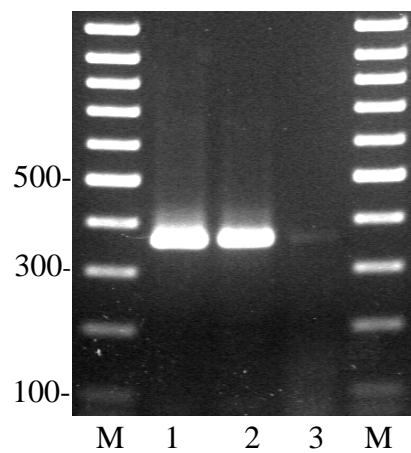


Abb. 15:  
Amplikons des Gens *tst* von zwei *S. aureus*-Isolaten (1, 2) mit einer Größe von 350 Bp. M siehe Abb. 13

Tabelle 9:

Nachweis von Enterotoxigenen und *tst* innerhalb der 47 untersuchten *S. aureus*-Kulturen von Schafen und Ziegen

Nachgewiesene Gene bzw. Genmuster	Schaf	Ziege
<i>sec</i>	2*	-
<i>seg</i>	2	1
<i>sei</i>	1	-
<i>tst</i>	1	-
<i>sec + tst</i>	22	3
<i>seg + tst</i>	1	-
<i>sec + seg</i>	2	-
<i>sec + sei</i>	3	-
<i>sec + seg + tst</i>	1	-
<i>sec + sei + tst</i>	1	-

\*Anzahl der Kulturen

Bei keiner der Isolate konnten die Gene *sea*, *seb*, *sed*, *see*, *seh*, *sej*, sowie *eta* und *etb* nachgewiesen werden.

Tabelle 10:

Enterotoxinbildungsvermögen (A-E) und Nachweis der Enterotoxingene (*sea-see*) innerhalb der 47 untersuchten *S. aureus*-Isolate von Schafen (n=42) und Ziegen (n=5).

Enterotoxin bzw. Enterotoxigen	Toxinbildungsvermögen (SE)		Nachgewiesenes Gen (se)	
	Schaf	Ziege	Schaf	Ziege
SEA / <i>sea</i>	1*	1	-	-
SEB / <i>seb</i>	-	-	-	-
SEC / <i>sec</i>	28	1	31	3
SED / <i>sed</i>	-	-	-	-
SEE / <i>see</i>	-	-	-	-

\* Anzahl der Kulturen

## 5 Diskussion

Alle 47 in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kulturen, isoliert von Schaf (n=42) und Ziege (n=5), konnten aufgrund ihrer kulturellen, biochemischen und molekularen Eigenschaften als *S. aureus* identifiziert werden. Zum Nachweis der Eigenschaften Telluritreduktion und Lipolyse erfolgte die Anzüchtung der Kulturen auf dem Staphylokokken-Selektivnährmedium nach Baird-Parker (BAIRD-PARKER, 1962). Alle Kulturen reduzierten Tellurit zu schwarzem Tellur, bei drei Kulturen vom Schaf und einer Kultur von der Ziege konnte darüber hinaus eine Proteolyse und eine Lipolyse beobachtet werden. Dies zeigte sich als schmalen weißen Ring um die Kolonien. Weiterhin konnten für alle 47 *S. aureus* die Eigenschaften Kochsalztoleranz und Mannitvergärung mit Hilfe des Mannit-Kochsalz-Phenolrot Agars, einem nach CHAPMAN (1945) modifizierten Selektivagar für pathogene Staphylokokken, nachgewiesen werden. Der Mannit-Kochsalz-Phenolrot Agar eignet sich in der Routinediagnostik zur Isolierung von Staphylokokken aus verunreinigten Proben, da er durch den Zusatz von Natriumchlorid das Wachstum von Begleitkeimen hemmt (CHAPMAN, 1945).

Nach ELEK und LEVY (1950) ist die Bildung von Hämolyسين bei fast allen pathogenen Staphylokokkenarten nachweisbar. Hämoly sine schädigen Erythrozyten, was sich durch Hämoly sereaktionen auf Blutagarplatten untersuchen läßt. Bei dem  $\alpha$ -Hämoly sin handelt es sich um ein zytotoxisch wirkendes Polypeptid welches die Bildung von transmembranalen Kanälen in der Zellmembran bewirkt und durch die Freisetzung von Ionen ein Platzen der Membran infolge osmotischer Lyse hervorruft (HARSHMAN et al., 1989; BHAKDI und TRANUM-JENSEN, 1991; BOERLIN und NICOLET, 2002). Laut ROLLE und MAYR (1993) lysiert das  $\alpha$ -Hämoly sin die Erythrozyten von Kaninchen, Schaf, Rind und Ziege. Bei dem Staphylokokken- $\beta$ -Hämoly sin handelt es sich um eine Sphingomyelinase, die durch Spaltung des Sphingomyelins der Erythrozytenmembran eine Membranschädigung bewirkt. Die Empfindlichkeit der Erythrozyten ist vom Gehalt des Sphingomyelins in der Erythrozytenmembran abhängig, der laut THELESTAM (1983) mit 50 % bei Erythrozyten von Rind, Ziege und Schaf im Gegensatz zu den Erythrozyten anderer

Säuger (15-25 %) relativ hoch ist. Daher eignet sich die Anzüchtung der Bakterien auf Schafblutagarplatten besonders gut für den Nachweis des Staphylokokken- $\beta$ -Hämolysins. Die Mehrzahl der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kulturen, isoliert vom Schaf (n=23, 54 %) sowie alle fünf Ziegenkulturen, zeigten auf Schafblutagar eine  $\alpha$ -Hämolysen, 13 Kulturen vom Schaf (31 %) wiesen eine  $\beta$ -Hämolysen auf. Nach JONSSON et al. (1985) gehört das  $\alpha$ -Hämolysin zu den bedeutendsten Virulenzfaktoren von *S. aureus* und kommt bei Tierisolaten häufig gemeinsam mit dem  $\beta$ -Hämolysin vor. Dies konnte bei den Kulturen der vorliegenden Untersuchung nicht beobachtet werden. Die Hämolysine bzw. Toxine können desweiteren aufgrund synergistischer bzw. antagonistischer Wechselwirkungen mit Stoffwechselprodukten anderer Bakterienspezies unterschieden werden (SKALKA et al., 1979; HÉRBERT und HANCOCK, 1985; LÄMMLER und BLOBEL, 1987). In den vorliegenden Untersuchungen zeigten zwei der vom Schaf isolierten Kulturen (5 %) nach der ursprünglich von SKALKA et al. (1979) beschriebenen Methode eine  $\delta$ -Hämolysen, d.h. eine schmale Zone vollständiger Hämolysen sowie eine halbmondförmige vollständige Hämolysenzone im Bereich des *S. aureus*- $\beta$ -Hämolysins. Zwei weitere Kulturen (5 %) wiesen eine  $\delta$ -like-Hämolysen, d.h. eine vollständige Hämolysen im Bereich des *S. aureus*- $\beta$ -Hämolysins bei ansonsten fehlender Hämolysen, auf. Die verbleibenden zwei Kulturen (5 %) zeigten keine Hämolysen. Die im vorliegenden aufgeführten Nachweise der Hämolysine basieren auf Untersuchungsergebnissen mit Blutagarplatten. Laut CLYNE et al. (1992) hemmen die darin möglicherweise enthaltenen sulfonierten Polymere (Agar, Heparin, Dextran-Sulfat) bzw. Lipide (Phospholipide, Fettsäuren und Cholesterol) das  $\gamma$ -Hämolysin, weshalb sein Vorkommen hier nicht überprüft werden konnte.

Zum Nachweis der Pigmentbildung wurden die Staphylokokkenkulturen nach LÄMMLER et al. (1986) auf Nitrozellulosemembranen angezüchtet. Der Vorteil dieses Verfahrens im Vergleich zu anderen Untersuchungsmöglichkeiten, wie zum Beispiel dem Nachweis der Pigmentbildung nach Kultivierung auf Chapman-Agar liegt darin, dass die Bewertung der Pigmentierung auf der einheitlich weißen Nitrozellulosemembran besser zu interpretieren ist als auf einem farbigen Nährboden. Innerhalb der untersuchten *S. aureus*-Kulturen bildete die überwiegende Zahl der Kulturen, d.h. 30 Isolate vom Schaf (71,4 %) und ein Isolat von der Ziege (20 %), ein

gelbes Pigment. Vier Isolate vom Schaf (9,5 %) und drei Isolate von der Ziege (60 %) waren orange, fünf Isolate vom Schaf (11,9 %) waren hellgelb pigmentiert. Drei Isolate vom Schaf (7,2 %) und ein Isolat von der Ziege (20 %) wuchsen als weiße, unpigmentierte Kolonien. Eine vergleichbare Pigmentbildung kann bei unterschiedlichen Staphylokokkenarten, wie z.B. *Staphylococcus arlettae*, einigen *Staphylococcus capitis* subsp. *ureolyticus*, einigen *Staphylococcus caseolyticus* und einigen *Staphylococcus cohnii* subsp. *ureolyticus* (SCHLEIFER und KLOOS, 1994) beobachtet werden und kann somit nicht als zuverlässiges Merkmal zur Differenzierung von *S. aureus* herangezogen werden (BAIRD-PARKER, 1963; BRÜCKLER et al. 1994).

Die Koagulasereaktion zum Nachweis der extrazellulären Substanz Koagulase, der Nachweis des fibrinogenbindenden Clumping-Faktors sowie der Nachweis des IgG-bindenden Oberflächenrezeptors Protein A dienen als weitere Eigenschaften, um die untersuchten Stämme der vorliegenden Arbeit als *S. aureus* zu identifizieren. Alle Kulturen zeigten in dem nach BRÜCKLER et al. (1994) zum Nachweis der Koagulase durchgeführten Röhrchentest innerhalb von 24 h eine Koagulation des Kaninchenplasmas. Auch in dem nach CADNESS-GRAVES et al. (1943) durchgeführten Objektträgeretest mit Kaninchenplasma zum Nachweis des Clumping-Faktors zeigten alle im vorliegenden untersuchten *S. aureus*-Isolate eine deutliche Agglutinationsreaktion. Das gleiche Ergebnis lieferte das kommerzielle Nachweisverfahren Staphaurex-Plus. Dieses Verfahren ermöglicht den gleichzeitigen Nachweis des Clumping-Faktors und von Protein A und verwendet Latexpartikel die mit Fibrinogen bzw. IgG beschichtet sind. Eine positive Reaktion zeigte sich in einer Agglutination der Latexpartikel und war bei allen im vorliegenden untersuchten *S. aureus*-Kulturen von Schaf und Ziege zu beobachten. Die Latexpartikel des kommerziellen Nachweisverfahrens sind ferner mit Antikörpern beladen, die mit Kapselpolysacchariden der Staphylokokkenoberfläche reagieren. Dies ermöglicht den Nachweis bekapselter *S. aureus*, bei denen es laut BLACKSTOCK et al. (1968) zu einer Überlagerung des Clumping-Faktors durch Kapselpolysaccharide kommen kann, was im Objektträgeretest ein falsch negatives Ergebnis liefern könnte. MYRICK und ELLNER (1982) beschrieben Latex-Testkits als verlässliche Methode zum Nachweis von *S. aureus* in klinischen Labors. PAPSIAN und GARRISON untersuchten 1999 die Spezifität unterschiedlicher Testkits zur Identifizierung von *S. aureus* und stellten fest, dass mit dem in der vorliegenden Untersuchung

verwendeten „Staphaurex-Plus Testsystem“ Staphylokokken mit 100 %iger Genauigkeit entdeckt werden konnten.

Die weitere Untersuchung der Kulturen erfolgte durch den Nachweis der Enzyme DNase und Thernonuklease. Das Vorhandensein dieser Enzyme wurde mit Hilfe des Fertignährmediums DNase-Testagar nach JEFFRIES et al. (1957) bzw. LACHICA et al. (1976), untersucht. In Übereinstimmung mit den Angaben dieser Autoren erwiesen sich alle untersuchten *S. aureus*-Kulturen, isoliert von Schaf und Ziege, als DNase- bzw. thernonukleasepositiv. Das Vorhandensein dieser beiden Enzyme zeigte sich durch die Bildung von rosafarbenen Höfen um die Kolonien. BOCKLISCH und WORBES (1993) untersuchten in einem Zeitraum von fünf Jahren 849 Milchproben von mastitiskranken Schafen und erzielten bezüglich der DNase ein vergleichbares Ergebnis. D.h. 20 % der von diesen Autoren untersuchten Milchproben enthielten *S. aureus*-Kulturen, die alle DNase positiv waren. Auch KLOOS und SCHLEIFER (1986) beschrieben in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen den Nachweis des Enzyms Thernonuklease als diagnostisches Kriterium zur Abgrenzung von *S. aureus*-, *Staphylococcus intermedius*- sowie *Staphylococcus hyicus*-Kulturen gegenüber anderen Staphylokokkenarten.

Übereinstimmend mit BRÜCKLER et al. (1994) konnte bei allen untersuchten Kulturen das Enzym Hyaluronidase nachgewiesen werden. Nach diesen Autoren wird die Hyaluronidase vor allem von pathogenen Staphylokokken gebildet und ist bei nahezu allen koagulasepositiven Staphylokokken nachweisbar. Die Bildung des Enzyms Hyaluronidase wurde mittels des von WINKLE (1979) beschriebenen Dekapsulationstest geprüft und zeigte sich als Hemmung des mukoiden Wachstums einer *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*-Testkultur. SKALKA (1985) beschrieb diesen Dekapsulationstest als geeignete und zuverlässige Methode zur Differenzierung von *S. aureus* und *S. intermedius*.

Bei einigen der 47 untersuchten *S. aureus*-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen konnten Resistenzen gegenüber einem oder mehreren Antibiotika festgestellt werden. Diese Antibiotikaresistenzen können unterschiedliche Ursachen haben. ROSIN (1996) und KROKER (1997) unterschieden zwischen der „natürlichen Resistenz“, bei der den Bakterien der Angriffspunkt des Chemotherapeutikums fehlt, der „chromosomal

determinierten Resistenz“, die durch Mutation von ansonsten empfindlichen Bakterien entsteht, und der übertragbaren Resistenz. Letztere beruht z.B. auf dem Erwerb zusätzlicher Erbinformationen, welche außerhalb des Chromosoms auf Plasmiden liegen und ein oder mehrere Resistenzgene enthalten können.

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten *S. aureus*-Kulturen konnten Resistenzen gegenüber dem  $\beta$ -Lactamantibiotikum Penicillin G beobachtet werden. Innerhalb der vom Schaf isolierten Kulturen erwiesen sich jeweils fünf Kulturen (12 %) als penicillinresistent; zwei *S. aureus*-Isolate von der Ziege (40 %) waren ebenso penicillinresistent. Die übrigen untersuchten Kulturen, d.h. 37 Isolate vom Schaf (89 %) und drei Isolate von der Ziege (60 %) erwiesen sich gegenüber Penicillin G als empfindlich. BOERLIN und NICOLET (2002) beschrieben für *S. aureus* eine seit den achtziger Jahren zunehmende Resistenz gegenüber Penicillinen, Streptomycin, Sulfonamiden und Erythromycin. STEPHAN et al. (1999) fanden bei 14 % der insgesamt 63 von diesen Autoren untersuchten *S. aureus*-Kulturen, isoliert von Rindermastitiden, Antibiotikaresistenzen, dies insbesondere gegenüber Penicillinen. ADESIYUN et al. (1992) untersuchten *S. aureus*, isoliert von Mensch, Tier, darunter auch Ziegen, und Lebensmitteln in Nigeria und stellten fest, dass fast alle TSST-1 produzierenden *S. aureus*-Kulturen penicillinresistent waren.

Penicilline und Cephalosporine gehören zur Gruppe der  $\beta$ -Lactamantibiotika und wirken bakteriozid auf proliferierende Keime. Ihr  $\beta$ -Lactam-Ring reagiert mit der Mureintranspeptidase, einem für den Aufbau der Bakterienzellwand wichtigen Enzym. Einige Bakterien, insbesondere *S. aureus*, sind in der Lage  $\beta$ -Lactamasen zu bilden (BRANDER et al., 1991; KROKER., 1997). Laut GRÄFE (1992) werden diese Enzyme sowohl chromosomal als auch durch Plasmide kodiert und stellen klinisch die bedeutsamste Ursache der bakteriellen Resistenzen gegen Penicilline und andere  $\beta$ -Lactamantibiotika dar. BRANDER et al. (1991), GRÄFE (1992) sowie DYKE und GREGORY (1997) konnten innerhalb der von ihnen untersuchten Staphylokokken ebenso eine vermehrte Penicillinresistenz feststellen. Laut BRANDER et al. (1991), GRÄFE (1992) sowie BRAKSTAD und MAELAND (1997) führen Modifikationen der penicillinbindenden Proteine (PBPs) zu Resistenzen von Staphylokokken gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika. Trotz dieser Resistenzerscheinungen sind  $\beta$ -Lactamantibiotika in



der Veterinärmedizin aufgrund ihrer guten bakterioziden Wirksamkeit und ihrer geringen Toxizität Mittel der Wahl. Der Vorteil in der Verwendung von Oxacillin gegenüber Penicillin liegt neben der höheren Stabilität gegenüber  $\beta$ -Lactamasen in der Möglichkeit der oralen und auch intramammären Verabreichung. Dies ist besonders im Rahmen der Mastitistherapie von Bedeutung (BRANDER et al., 1991; KROKER, 1997).

Cephalosporine haben den gleichen Wirkungsmechanismus wie Penicilline und zählen ebenfalls zu den  $\beta$ -Lactamantibiotika. Beim Auftreten von Penicillin- oder Oxacillinresistenzen treten laut KROKER (1997) oft Kreuzreaktionen mit Cephalosporinen auf. Vergleichbares konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Lediglich eine Kultur, isoliert vom Schaf zeigte ein intermediäres Verhalten gegenüber Cefoperazon, einem Cephalosporin der dritten Generation. Alle anderen Kulturen, 41 Isolate vom Schaf (98 %) und alle fünf Ziegenisolate, erwiesen sich als empfindlich gegenüber Cefoperazon. ROSIN (1996) und OBERDISSE et al. (1997) beschrieben das Vorkommen unterschiedlicher  $\beta$ -Lactamasen, den hauptsächlich bei *S. aureus* vorkommenden Penicillinasen, sowie den hauptsächlich bei gramnegativen Keimen vorkommenden Cephalosporinasen. Nach SCHADEWINKEL-SCHERKL und SCHERKL, (1995) beeinflussen die Staphylokokken- $\beta$ -Laktamasen die Wirkung der Cephalosporine kaum, was mit den im vorliegenden beobachteten Ergebnissen übereinstimmt. Nach BOERLIN und NICOLET (2002) gehören die Cephalosporine neben penicillinaseresistenten  $\beta$ -Laktamen, Gentamicin und den Fluorchinolonen zu den wirksamsten Antibiotika zur Bekämpfung von Staphylokokkeninfektionen.

Der Angriffspunkt der Aminoglykosidantibiotika, wie z.B. Gentamicin, liegt nach ROSIN (1996) und KROKER (1997) in der Translationsphase der Proteinsynthese. Die Entwicklung von Resistenzen gegenüber diesen Antibiotika erfolgt nach den oben genannten Autoren plasmidvermittelt, durch Aufnahme von Resistenzfaktoren (R-Faktoren). Bei den hier untersuchten Kulturen zeigten 20 Isolate vom Schaf (48 %) und drei Isolate von der Ziege (60 %) ein intermediäres Verhalten gegenüber Gentamicin, die übrigen Kulturen, d.h. 22 Isolate vom Schaf (52 %) und zwei Isolate von der Ziege (40 %) erwiesen sich als empfindlich.

Tetracyclin und Minocyclin gehören zur Gruppe der „klassischen Breitbandantibiotika“ und wirken durch Hemmung der Proteinsynthese bakteriostatisch. Resistenzen sind plasmid- oder chromosomalvermittelt und entstehen durch eine von den Tetracyclinen selbst induzierte Inhibition des Transportprozesses in die Bakterienzelle (ROSIN, 1996; KROKER, 1997). Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten *S. aureus*-Isolaten konnten keine Resistenzen gegenüber Tetracyclin beobachtet werden. Nach ROSIN (1996) kann es vorkommen, dass Minocyclin bei einigen tetracyclinresistenten Stämmen wirksam bleibt. Alle im vorliegenden untersuchten *S. aureus*-Kulturen, isoliert von Schaf und Ziege, erwiesen sich als empfindlich gegenüber Tetracyclin und Minocyclin.

Erythromycin gehört zur Gruppe der Makrolidantibiotika, welche die Proteinbiosynthese behindern und dadurch bakteriostatisch wirken (KROKER, 1997). Nach ROSIN (1996) können plasmidvermittelte Resistenzen auftreten. Alle *S. aureus*-Kulturen der vorliegenden Untersuchung erwiesen sich als erythromycinempfindlich.

Laut KROKER (1997) wird Clindamycin der Gruppe der Lincosamide zugeordnet und wirkt bakteriostatisch. Sein Angriffspunkt ist das bakterielle Ribosom. Die Resistenzentwicklung erfolgt meist durch den Transfer von R-Faktoren. In den vorliegenden Untersuchungen erwies sich lediglich eine der untersuchten Kulturen vom Schaf (2 %) als resistent, alle übrigen Kulturen waren diesem Antibiotikum gegenüber empfindlich.

Bei den bakteriostatisch wirkenden Sulfonamiden handelt es sich nach ROSIN (1996) und KROKER (1997) um Derivate des p-Amino-Benzoe-Sulfonamids, welches das Bakterienwachstum durch Hemmung der Folsäuresynthese unterbinden. Eine natürliche Resistenz besteht bei den Bakterien, die nicht darauf angewiesen sind selbst Folsäure zu synthetisieren. Laut ROSIN (1996) waren häufig plasmidvermittelte Resistenzen zu beobachten. Durch die Kombination von Trimethoprim mit Sulfonamiden wird die bakterielle Folsäuresynthese an zwei aufeinanderfolgenden Schritten gehemmt und die Wirksamkeit dieser beiden Substanzen somit potenziert (KROKER, 1997). Alle im vorliegenden untersuchten *S. aureus*-Kulturen, isoliert von Schaf und Ziege, erwiesen sich als empfindlich gegenüber Sulfmethoxazol/Trimethoprim (SXT).

Enrofloxacin gehört nach ROSIN (1996) und KROKER (1997) zur Gruppe der Fluorchinolone und hat sowohl bakteriostatische als auch bakterizide Wirkung. Im Verlauf einer Behandlung können jedoch unter anderem chromosomal determinierte Resistenzen auftreten. Innerhalb der im vorliegenden untersuchten Isolate vom Schaf erwies sich je eine Kultur (2 %) als resistent, bzw. intermediär. Die übrigen Kulturen, d.h. 40 Isolate vom Schaf (96 %) und alle Isolate von der Ziege waren empfindlich gegenüber diesem Antibiotikum. In der Humanmedizin ist laut GEORGE et al. (1990) eine zunehmende Resistenz gegenüber Fluorchinolonen zu beobachten.

STEPHAN et al. (1998) untersuchten 63 *S. aureus*-Kulturen, isoliert von Rindermastitiden in der Schweiz, und stellten bei 22 % eine in vitro Resistenz gegenüber mindestens einem Antibiotikum fest. Bei den untersuchten Stämmen wiesen diese Autoren eine Penicillinresistenz nach, weiterhin kamen Resistenzen gegenüber Erythromycin und SXT vor. Alle von STEPHAN et al. (1998) untersuchten *S. aureus* waren empfindlich gegenüber Cefoperazon, Gentamicin und Tetracyclin. Ähnliche Ergebnisse bezüglich dem Auftreten von Resistenzen bei *S. aureus*-Kulturen wurden bereits von WINTER und DEUTTZ (1998) für Österreich und MÜLLER (1993) beschrieben. DE CENTORBI et al. (1988) untersuchten 36 *S. aureus*, isoliert von jungen Ziegen im Rahmen der Schlachttieruntersuchung und stellten fest, dass alle Stämme empfindlich gegenüber Clindamycin und Gentamicin, 94 % empfindlich gegenüber Erythromycin und Tetracyclin und 53 % empfindlich gegenüber Penicillin waren. Nach ROSIN (1996) sind Penicilline, Makrolide und Lincosamide nach wie vor wirksam gegen grampositive Bakterien. BOERLIN und NICOLET (2002) empfehlen insbesondere für *S. aureus*-Infektionen bei Schaf und Ziege die Verabreichung von  $\beta$ -Lactamantibiotika (Penicillin, Cloxacillin) oder Makroliden (Erythromycin, Spiramycin). Alternativ kann laut diesen Autoren ebenfalls eine Therapie mit Aminoglycosiden (Gentamicin, Neomycin) versucht werden, gut bewährt hat sich ebenfalls die Kombination von Penicillin und einem Aminoglycosidantibiotikum.

Die Identifizierung von Bakterien beruht in den meisten Laboratorien bislang auf kulturellen, biochemischen und serologischen Eigenschaften der Mikroorganismen. Diese Verfahren sind nützlich, ermöglichen aber häufig eine Diagnosestellung erst nach 1-2 Tagen. Darüber hinaus kann es bei Bakterien zu unterschiedlicher Expression ihrer phänotypischen Eigenschaften kommen, was zu falsch-positiven bzw. falsch-negativen

Diagnosen führen kann. Eine deutliche Verbesserung der Identifizierungsmöglichkeiten bieten hier molekularbiologische Untersuchungsverfahren. Dafür erwiesen sich in der vorliegenden Arbeit insbesondere Analysen von speziesspezifischen Genabschnitten der 23S rRNA, der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region (ISR), sowie eines *S. aureus*-spezifischen chromosomalen Genabschnitts als hilfreich.

Die 23S rRNA bildet einen wesentlichen Teil des bakteriellen Ribosoms und enthält bei allen Bakterien vorkommende konstante, sowie auch variable Genabschnitte. Bestimmte variable Genabschnitte des 23S rRNA-Gens von *S. aureus* erwiesen sich laut STRAUB et al. (1999) als speziesspezifisch für diese Spezies. Diese Autoren verglichen unter anderem die 23S rRNA-Gene von *S. aureus*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus piscifermentans*, *Staphylococcus condimenti* und *Staphylococcus epidermidis* und stellten für jede Spezies typische Sequenzvariationen fest. In vergleichbaren Untersuchungen wurden speziesspezifische Abschnitte des 23S rRNA-Gens bereits zur Identifizierung von *Streptococcus* spp. (HARLAND et al., 1993; SULTANA et al., 1998), *Enterococcus faecium* (NAÏMI et al. 1999), *Yersinia enterocolitica* (SKURNIK und TOIVANEN, 1991), *Listeria* spp. (SALLEN et al. 1996), *Campylobacter jejuni* sowie thermophilen *Campylobacter* spp. (EYERS et al., 1993; KONKEL et al., 1994), *Coxiella burnetii* (AFSETH und MALLAVIA, 1995), *Pasteurella multocida* (MIFLIN und BLACKALL, 2001) und *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (PREUSS et al., 1992) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnte unter Verwendung der von STRAUB et al. (1999) für das 23S rRNA-Gen beschriebenen speziesspezifischen Oligonukleotidprimer Staur4 und Staur6 bei allen untersuchten *S. aureus*-Kulturen von Schaf und Ziege ein einheitliches Amplikon mit einer Größe von 1250 Bp nachgewiesen werden. Das von STRAUB et al. (1999) beschriebene PCR-vermittelte Identifizierungsverfahren erwies sich somit auch für *S. aureus*-Kulturen dieser Herkunft als einsetzbar.

Bei der ISR handelt es sich um den zwischen der 16S- und der 23S rRNA liegenden Bereich der ribosomalen RNA. FORSMAN et al. (1997) untersuchten die ISR spezifische rDNA verschiedener Mastitiserreger vom Rind und stellten sowohl in der Länge als auch in der Sequenz mehr Variationen fest als bei dem angrenzenden 23S rRNA-Gen. Diese Autoren nutzten die Sequenzvariationen der ISR zur Erstellung von speziesspezifischen Oligonukleotidprimern, unter anderem auch für *S. aureus*. Mit

diesen Primern war zunächst bei allen untersuchten *S. aureus* der vorliegenden Arbeit eine Amplifizierung der ISR möglich. Die Amplikons der untersuchten Kulturen zeigten Größenpolymorphismen. Die Mehrzahl der Kulturen, d.h. 22 Isolate vom Schaf (52 %) und alle fünf Ziegenisolate, wiesen hierbei ein Amplikon mit einer Größe von 430 Bp auf. Dies stimmte weitgehend mit den Ergebnissen von FORSMAN et al. (1997) überein, die für *S. aureus* ein Amplikon mit einer Größe von 420 Bp beschrieben. Innerhalb der Kulturen der vorliegenden Untersuchung vom Schaf wiesen 17 Isolate (41 %) eine Amplikongröße von 400 Bp auf, bei drei Isolaten vom Schaf (7 %) konnte ein Amplikon mit einer Größe von 460 Bp nachgewiesen werden. HASSAN (2002) konnte ebenfalls bei den von ihm untersuchten *S. aureus*-Isolaten ISR-Amplikons mit einer Größe von 400 und 420 Bp nachweisen. Diese Genpolymorphismen eignen sich als molekulare Marker zur Genotypisierung einzelner *S. aureus*. Dies kann hilfreich in epidemiologischen Fragestellungen sein.

MARTINEAU et al. (1998) beschrieben ein für *S. aureus*-spezifisches chromosomales Fragment des bakteriellen Genoms und bezeichneten es mit Sa442. Die Sequenzierung dieses 108 Bp großen Abschnitts ermöglichte diesen Autoren die Erstellung speziesspezifischer Primer. Übereinstimmend mit MARTINEAU et al. (1998) konnte in den vorliegenden Untersuchungen für alle *S. aureus*-Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 110 Bp nachgewiesen werden. Laut MARTINEAU et al. (1998) kann der PCR-vermittelte Nachweis von *S. aureus* innerhalb einer Stunde durchgeführt werden und eignet sich auch zum Nachweis von *S. aureus* aus klinischem Probenmaterial.

Eine weitere PCR-vermittelte Identifizierung von *S. aureus* war durch den Nachweis des Clumping-Faktor-Gens *clfA* möglich. Übereinstimmend mit HASSAN (2002) und STEPHAN et al. (2001) wiesen alle untersuchten Kulturen der vorliegenden Untersuchung für das *clfA*-Gen ein typisches Amplikon mit einer Größe von 970 Bp auf. Die von AKINEDEN et al. (2001) und HASSAN (2002) beschriebenen Größenpolymorphismen für das *clfA*-Gen konnten in den hier vorliegenden Untersuchungen nicht beobachtet werden. Diese Autoren ermittelten in ihren Untersuchungen Amplikons mit einer Größe von 970 sowie 1000 Bp.

Das *nuc*-Gen kodiert laut BRAKSTAD et al. (1992) die extrazelluläre *S. aureus*-Thermonuklease. Dieses Gen war ebenso zur molekularen Identifizierung von *S. aureus*

einsetzbar. Vergleichbar mit Untersuchungen dieser Autoren konnte in der hier vorliegenden Arbeit bei allen untersuchten *S. aureus*-Isolaten das entsprechende Gen nachgewiesen werden. Wie von BRAKSTAD et al. (1992) sowie HASSAN (2002) beschrieben ergaben die PCR-Analysen der vorliegenden Untersuchungen für alle Isolate von Schaf und Ziege ein einheitliches Amplikon mit einer Größe von 280 Bp.

Bei der im weiteren Verlauf der vorliegenden Untersuchungen durchgeführten Amplifizierung des Koagulase-Gens *coa* von *S. aureus* nach HOOKEY et al. (1998) konnten Größenpolymorphismen festgestellt werden. Das *coa*-Gen kodiert ein Protein welches aus einer konstanten sowie einer variablen Region besteht. Die variable Region des korrespondierenden *coa*-Gens setzt sich aus einer unterschiedlichen Anzahl sich wiederholender, 81 Bp-großer Einheiten, sogenannter „Repeats“, zusammen, deren Anzahl die unterschiedlichen Amplikongrößen der einzelnen Genabschnitte bedingen. Die von HOOKEY et al. (1998) auch im vorliegenden zur Amplifizierung eines Teils des *coa*-Gens gewählten Primer setzten kurz vor, bzw kurz hinter dem die „Repeats“ beinhaltenden Bereich an. Die Primer schlossen einen 214 Bp großen Bereich des konstanten Anteils des *coa*-Gens mit ein. Die Zusammenhänge zwischen der Amplikongröße und der Anzahl an „Repeats“ wurden nach den Angaben von KAIDA et al. (1989) und HOOKEY et al. (1998) rechnerisch ermittelt. Bei der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten PCR zur Amplifizierung des Koagulase-Gens konnten Amplikons mit Größen von 370, 560, 640, 720 und 800 Bp beobachtet werden. Die Mehrzahl der Isolate, d.h. 24 Kulturen vom Schaf (57,1 %) und zwei Kulturen von der Ziege (40 %), wiesen ein Amplikon mit einer Größe von 800 Bp und entsprechend sieben „Repeats“ auf. Ein Amplikon mit einer Größe von 560 Bp, entsprechend vier „Repeats“ war bei sieben Isolaten vom Schaf (16,7 %) und einem Isolat von der Ziege (20 %) zu beobachten, sechs Isolate vom Schaf (14,3 %) und ein Isolat von der Ziege (20 %) hatten ein Amplikon mit einer Größe von 640 Bp, entsprechend fünf „Repeats“. Bei drei Isolaten vom Schaf (7,1 %) und einem Isolat von der Ziege (20 %) konnte ein Amplikon mit einer Größe von 720 Bp, entsprechend sechs „Repeats“ nachgewiesen werden. Ein Amplikon mit einer Größe von 370 Bp und somit zwei „Repeats“ wiesen lediglich zwei Schafkulturen (4,8 %) auf. Vergleichbare Ergebnisse beschrieben HOOKEY et al. (1998) die Amplikons mit Größen von 547, 603, 660 und 875 Bp nachwiesen. STEPHAN et al. (2001) beschrieben *coa*-Gen PCR-Produkte mit Größen von 580 und 660 Bp. Laut SCHMITZ et al. (1998) kann die Anzahl der 81 Bp großen

„Repeats“ zwischen vier und acht variieren. In der vorliegenden Untersuchung konnten dagegen Variationen zwischen zwei und sieben „Repeats“ nachgewiesen werden. Der PCR-vermittelte Nachweis des *coa*-Gens stellt ebenso wie die zuvor beschriebenen Genabschnitte ein zuverlässiges Merkmal zur Identifizierung und Differenzierung von *S. aureus* dar. Die Bedeutung der unterschiedlichen Anzahl an „Repeats“ für die Virulenz einzelner *S. aureus* ist bislang noch unklar. Die Genpolymorphismen eignen sich jedoch ebenso wie die zuvor beschriebenen möglichen Genpolymorphismen der ISR und des Clumping-Faktor-Gens *clfA* zur Genotypisierung der Kulturen und zur Untersuchung mutmaßlicher epidemiologischer Zusammenhänge.

Bei dem Protein A von *S. aureus* handelt es sich um einen Zellwandbestandteil, der unter anderem die Eigenschaft besitzt das Fc-Fragment des IgG-Moleküls zu binden. Am C-terminalen Ende des Protein A befindet sich die als X-Region bezeichnete zellwandbindende Region, welche keine Bindungsaffinität für das Fc-Stück des IgG-Moleküls besitzt (UHLÉN et al., 1984). Nach FRÈNAY et al. (1994) besteht die X-Region des Protein A aus einem konstanten Bereich sowie aus unterschiedlich vielen, sich wiederholenden Einheiten („Repeats“). Der Nachweis des Protein A kodierenden Gens *spa* und von Größenvariationen des die X-Region kodierenden Teil des Gens erfolgte in der vorliegenden Untersuchung mittels PCR mit den von FRÈNAY et al. (1996) beschriebenen Oligonukleotidprimern. Die von diesen Autoren verwendeten Primer haben ihre Ansatzstellen kurz vor und kurz hinter dem den 24 Bp großen, variablen Bereich der X-Region kodierenden Teil des Protein A-Gens *spa*. Die Primer schließen einen 28 Bp großen konstanten Anteil mit ein. Mit diesen Primern konnten in der vorliegenden Arbeit Amplikons mit Größen von 100, 220, 290, 320, 350 und 440 Bp nachgewiesen werden. Die Mehrzahl der Kulturen, d.h. 21 Isolate vom Schaf (50 %) und drei Isolate von der Ziege (60 %), hatten ein Amplikon mit einer Größe von 290 Bp und entsprechend elf „Repeats“; sieben Isolate vom Schaf (16,7 %) und ein Isolat von der Ziege (20 %) hatten ein Amplikon mit einer Größe von 350 Bp, entsprechend 13 „Repeats“. Bei sechs Isolaten vom Schaf (14,3 %) konnte ein Amplikon mit einer Größe von 320 Bp, entsprechend zwölf „Repeats“, bei fünf Isolaten vom Schaf (11,9 %) ein Amplikon mit einer Größe von 100 Bp, entsprechend drei „Repeats“ nachgewiesen werden. Zwei Isolate vom Schaf (4,8 %) und ein Isolat von der Ziege (20 %) hatten ein Amplikon mit einer Größe von 220 Bp, entsprechend acht „Repeats“, ein Isolat vom Schaf (2,3 %) zeigte ein Amplikon mit einer Größe von 440 Bp, entsprechend 17

„Repeats“. In Untersuchungen von FRÈNAY et al. (1994) lag die Anzahl der „Repeats“ zwischen drei und 15. Vergleichbare Ergebnisse ergaben auch Untersuchungen von ANNEMÜLLER (1999) mit *S. aureus*, isoliert von Vögeln, sowie von STEPHAN et al. (2001) bei *S. aureus*, isoliert von Rindermastitiden, die Amplikons mit Größen von 100 bis 320 Bp und entsprechend zwei bis elf „Repeats“ beobachteten. HASSAN (2002) wies für diese Region des Protein A-Gens *spa* Amplikons mit Größen von 100, 200, 280 und 300 Bp und entsprechend zwei, sechs, zehn und elf „Repeats“ nach. Die eigentliche Bedeutung der Variationen der X-Region für die Virulenz von *S. aureus*, sowie ihr Einfluß auf die IgG-Bindung, ist bislang noch nicht geklärt. Laut FRÈNAY et al. (1994) eignet sich dieser Bereich aufgrund seiner Größenpolymorphismen zur molekularen Identifizierung und Genotypisierung von *S. aureus*.

Die Nachweise des 23S rRNA-Gens, der ISR, der Nachweis des *S. aureus*-spezifischen chromosomalen Genabschnitts Sa442, und der Gene *clfA* und *nuc* erwiesen sich in den vorliegenden Untersuchungen als konstante Eigenschaften und ermöglichten eine schnelle und eindeutige Identifizierung der *S. aureus*, isoliert von Schaf und Ziege. Die Genabschnitte, die Größenpolymorphismen aufwiesen (ISR, *coa*, *spa*), erlauben eine Genotypisierung von Kulturen dieser Spezies und könnten, wie bereits erwähnt, für die Untersuchung epidemiologischer Zusammenhänge hilfreich sein. Bei den im vorliegenden untersuchten *S. aureus*-Kulturen unterschiedlicher Regionen und Länder waren keine epidemiologische Zusammenhänge zu erkennen.

Zur weiteren Charakterisierung der Kulturen der vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis von Toxingenen ebenfalls mittels PCR und vergleichsweise für die Enterotoxine SEA bis SEE deren Nachweis mittels eines kommerziellen Nachweissystems. Innerhalb der untersuchten Kulturen konnten die überwiegend gemeinsam auftretenden Toxingene *sec* und *tst* am häufigsten nachgewiesen werden. Bei 31 Isolaten vom Schaf (73,8 %) und drei Isolaten von der Ziege (60 %) konnte ein für *sec* typisches Amplikon von 240 Bp, bei 26 Isolaten vom Schaf (61,9 %) und ebenfalls drei Isolaten von der Ziege (60 %) ein für *tst* typisches Amplikon mit einer Größe von 350 Bp nachgewiesen werden. *Sec* kam bei 24 dieser Schaf- (52,4 %) sowie allen drei Ziegenkulturen (60 %) gemeinsam mit *tst* vor. Bei sieben Isolaten vom Schaf (4,8 %) konnte das *sec*-Gen alleine (n=2) oder zusammen mit *seg* (n=2) bzw. *sei* (n=3) nachgewiesen werden.

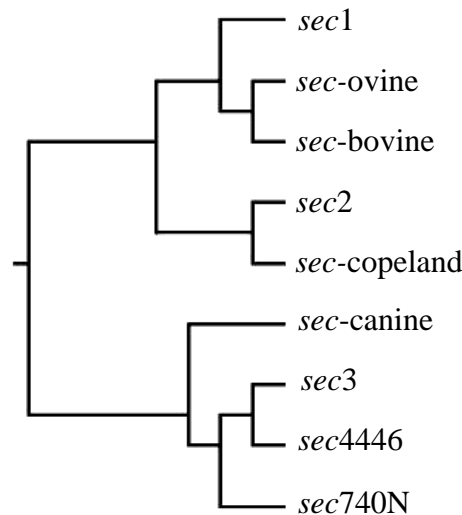


FITZGERALD et al. (2001) untersuchten das gemeinsame Auftreten der beiden Toxinegene *sec* und *tst* und führten es auf das Vorhandensein der mutmaßlichen Pathogenitätsinsel SaPI<sub>bov</sub> zurück, welche die Gene *tst* und *sec*-bovine, sowie das Enterotoxin-ähnliche Gen *sel* beinhaltet. SaPI<sub>bov</sub> ist nach diesen Autoren 15891 kb groß und enthält 21 offene Leserahmen. Der für *tst*-kodierende Abschnitt dieser Pathogenitätsinsel stimmt laut FITZGERALD et al. (2001) in der Sequenz mit der bereits 1998 von LINDSAY et al. beschriebenen Staphylokokken Pathogenitätsinsel SaPI<sub>I</sub> überein, welche die Gene *tst* und *ent*, getrennt von einem 10234 kb großen Bereich, beinhaltet. Da in der vorliegenden Untersuchung die Gene *sec* und *tst* hauptsächlich gemeinsam nachgewiesen werden konnten, scheint bei *S. aureus*-Isolaten von Schaf und Ziege vornehmlich die Pathogenitätsinsel SaPI<sub>bov</sub> von Bedeutung zu sein.

Innerhalb von SEC werden bislang die Subtypen SEC1, SEC2, SEC3, SEC-bovine, SEC-ovine, SEC-canine, *sec*4446, *sec*740N und *sec*-Copeland beschrieben (MARR et al., 1993; BOHACH und SCHLIEVERT, 1997; EDWARDS et al., 1997; SCHAD et al., 1997). CHEN et al. (2001) nutzten drei verschiedene Primerpaare zur Unterscheidung der für die unterschiedlichen SEC-Subtypen verantwortlichen Gene *sec*1, *sec*2 und *sec*3. Diese Autoren verwendeten hierbei Untersuchungen über *sec*1 bis *sec*3-Nukleotidsequenzen von BOHACH und SCHLIEVERT (1987), COUCH und BETLEY (1989), HOVDE et al. (1990) sowie EDWARDS et al. (1997). Die Nukleotidsequenzen der Gene aller bis jetzt in der Gendatenbank enthaltenen unterschiedlichen SEC Typen sowie die Ansatzstellen der in dieser Untersuchung verwendeten Oligonukleotidprimer sind im Anhang 1 vergleichend dargestellt. Alle *sec*-Subtypen könnten mit den in der vorliegenden Untersuchung gewählten Oligonukleotidprimern vermutlich aufgrund weitestgehender Sequenzgleichheit bezüglich der Primeransatzstelle nachgewiesen werden. Aufgrund fehlender Referenzstämme der neun bislang beschriebenen Subtypen war eine weitergehende Unterscheidung in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bislang nicht möglich. Innerhalb der im vorliegenden untersuchten *S. aureus* von Schaf und Ziege wird insbesondere der Subtyp *sec*-ovine vermutet. Die Verwandtschaftsbeziehungen der *sec*-Subtypen sind in Abb. 16 schematisch dargestellt.

Abb. 16

Darstellung der Verwandtschaftsbeziehungen der einzelnen *sec*-Subtypen mit Hilfe des Computerprogramms CLUSTAW



HO et al. (1989a, b) sowie LEE et al. (1992) beschrieben im weiteren TSST-ovine, eine bei *S. aureus*, isoliert von Schaf und Ziege vorkommende Variante von TSST-1 mit einem pI bei 8,5-8,6. Der pI von TSST-1 lag bei 7,0-7,2. HO et al. (1989a) untersuchten 18 Schaf- und 12 Ziegenstämme und konnten bei diesen *S. aureus*-Stämmen TSST-ovine nachweisen. Einer von insgesamt zehn von Rindern isolierten *S. aureus*-Stämme produzierte ebenfalls TSST-ovine, die übrigen sowie alle vom Menschen isolierten *S. aureus* bildeten TSST-1. Über das Vorkommen von *tst*-ovine innerhalb der *S. aureus*-Isolate der vorliegenden Untersuchung konnte aufgrund eines fehlenden Referenzstamms für *tst*-ovine und nur geringer Unterschiede in der Gensequenz beider Subtypen bislang keine Aussage getroffen werden. Die Nukleotidsequenzen von *tst* und *tst*-ovine sowie die Ansatzstellen der in dieser Untersuchung verwendeten Oligonukleotidprimer sind im Anhang 2 vergleichend dargestellt. Mit den in den vorliegenden Untersuchungen verwendeten Oligonukleotidprimern konnten aufgrund weitestgehender Sequenzgleichheit bezüglich der Primeransatzstelle beide Subtypen des *tst*-Gens von *S. aureus* nachgewiesen werden.

Zusätzlich zum PCR-vermittelten Gennachweis wurden die 47 *S. aureus*-Isolate der hier vorliegenden Untersuchungen mittels ELISA auf die Bildung der Enterotoxine SEA bis SEE untersucht. Hierbei konnte die Bildung von SEC bei 28 *S. aureus*-Kulturen (66,7 %), isoliert vom Schaf, und einer *S. aureus*-Kultur (20 %), isoliert von der Ziege, nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass, verglichen mit den Ergebnissen des Gennachweises, bei drei Schaf- (7,1 %) und zwei Ziegenkulturen (40 %) das *sec*-Gen, nicht aber die Bildung des Toxins nachweisbar war. Diese Unterschiede könnten darauf zurückzuführen sein, dass das Toxin bei diesen Kulturen nicht exprimiert wurde oder aber dass die gebildete Toxinmenge unter der Nachweisgrenze des verwendeten ELISA-Systems lag.

STEPHAN et al. (2001) untersuchten 34 enterotoxinproduzierende *S. aureus*-Stämme in der Nord-Ost Schweiz und konnten, vergleichbar mit den hier vorliegenden Ergebnissen, bei 23 der untersuchten Stämme das Gen *sec* sowie die Bildung des Toxins SEC nachweisen, 22 der SEC-Bildner hatten ebenfalls das Gen *tst*. ORDEN et al. (1992b) untersuchten die Enterotoxinproduktion von 81 *S. aureus*-Stämmen, isoliert von Schaf, Ziege und Rind, und konnten ebenfalls am häufigsten, insbesondere bei den Isolaten vom Schaf, das Toxin SEC nachweisen. GOGOV et al. (1984) untersuchten in Bulgarien 120 *S. aureus*, isoliert vom Schaf, und wiesen bei 75 % der Stämme die Bildung von SEC, bei 25 % die Bildung von SEA nach. In den vorliegenden Untersuchungen konnte mittels ELISA bei je einer Schaf- (2,4 %) und Ziegenkultur (20 %) die Bildung von SEA beobachtet werden, allerdings ohne dass das Gen *sea* mittels PCR nachgewiesen werden konnte. Diese Unterschiede im Toxin- bzw. Gennachweis könnten an unspezifischen Reaktionen des ELISA und somit falsch-positiven Ergebnissen liegen. Desweiteren könnte es durch Punktmutationen zu Veränderungen des *sea*-Gens, insbesondere an den Ansatzstellen der Primer, gekommen sein, so dass die PCR mit den hier verwendeten *sea*-spezifischen Primern nicht durchführbar war.

Bei einigen Kulturen der vorliegenden Untersuchungen konnten die Gene *seg* und *sei* nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen von JARRAUD et al. (1999, 2001) kamen diese Gene jedoch nur einzeln und nicht in Kombination vor. JARRAUD et al. (1999, 2001) stellten fest, dass die Gene für die Enterotoxine SEG und SEI bei *S. aureus*-Stämmen gemeinsam auf einem 3,2-kb großen DNA Fragment liegen

und durch einen 1,9 kb-großen Bereich getrennt sind. JARRAUD et al. beschrieben 2001 nach Sequenzanalysen der an diese *seg-sei* „intergenic spacer“-Region angrenzenden Bereiche, drei weitere Enterotoxin-ähnliche Leserahmen. Hierbei handelte es sich um *sem*, *sen* (ehemals *sek*) und *seo* (ehemals *sel*), sowie zwei Pseudogene ( $\psi$  *ent1* und  $\psi$  *ent2*). Nach diesen Autoren gehörten alle diese Gene, einschließlich der Gene *seg* und *sei*, zu dem als „enterotoxine gene cluster“ (*egc*) bezeichneten Operon. Die Toxine SEG, SEI, SEM, SEN (ehemals SEK) und SEO (ehemals SEL) wiesen Eigenschaften von Superantigenen auf. Laut JARRAUD et al. (2001) war *egc* vermutlich infolge von Mutationen (Duplikationen und Crossing-over) entstanden. Ähnliche Gen-Cluster sind, nach diesen Autoren, das Plasmid pIB485, welches die Gene *sed* und *sej*, getrennt von einem 895 Nukleotide großen Bereich, enthält (ZHANG et al., 1998), sowie die von FITZGERALD et al. (2001) beschriebene mutmaßliche Pathogenitätsinsel SaPIbov. AB et al. (2000) beschrieben eine Variante des SEG und bezeichneten diese mit SEGv. SEGv hat nach diesen Autoren 97,7 %ige Ähnlichkeit mit SEG. AB et al. (2000) konnten bei 27 von 48 untersuchten *S. aureus* Isolaten *seg* oder *segv* mittels PCR nachweisen.

Bislang konnten die Enterotoxine aufgrund ihrer Basen- bzw. ihrer Aminosäuresequenz in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zu der ersten Gruppe gehören SEA, SEE, SEJ, SED, und SEH, zu der zweiten Gruppe SEB und SEC (JARRAUD et al., 2001). Die Enterotoxine SEG und SEI konnten keiner dieser beiden Gruppen zugeordnet werden, wobei SEG allerdings nähere Verwandtschaft zu SEB und SEC zeigte, SEI dagegen Ähnlichkeiten mit SEM, SEN (ehemals SEK) und SEO (ehemals SEL) aufwies (MUNSON et al., 1998; JARRAUD et al., 2001; McCORMICK, 2001).

Die Toxingene *sea*, *seb*, *sed*, *see*, *seh*, und *sej* sowie die Gene für die exfoliativen Toxine *eta* und *etb* konnten bei den im vorliegenden untersuchten *S. aureus*-Kulturen nicht nachgewiesen werden.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich *S. aureus*-Kulturen, isoliert von Schaf und Ziege ebenso wie *S. aureus*-Isolate anderer Herkunft durch PCR vermittelte Nachweise des 23S rRNA-Gens, der ISR, des *S. aureus*-spezifischen chromosomalen Genabschnitts Sa442 und der Gene *clfA*, *nuc*, *coa* und *spa* eindeutig als *S. aureus* identifizieren. Einige diese Gene zeigen Größenpolymorphismen. Innerhalb der

untersuchten Toxingene waren die Gene *sec* und *tst*, häufig gemeinsam, nachweisbar. Im weiteren konnten vereinzelt die Gene *seg* und *sei* nachgewiesen werden. Obwohl *sec* und *tst* die am häufigsten nachgewiesenen Toxingene bei *S. aureus*-Isolaten dieser Herkunft waren ist bislang ist noch unklar, ob das Vorkommen der Gene bzw. Toxine für den größtenteils schweren Verlauf der *S. aureus*-Infektion bei Schaf und Ziege verantwortlich ist.

## 6. Zusammenfassung

In den vorliegenden Untersuchungen wurden 47 *S. aureus*-Kulturen, davon 42 Kulturen isoliert vom Schaf, und fünf Kulturen isoliert von der Ziege, aufgrund kultureller, biochemischer und molekularer Eigenschaften identifiziert und weitergehend charakterisiert.

Alle Kulturen wuchsen auf Staphylokokken-Selektivnährmedien, wiesen überwiegend die für Staphylokokken typischen Hämolyseformen, sowie eine gelb bis orange Pigmentierung auf und zeigten die staphylokokkenspezifischen Eigenschaften Koagulase, Clumping-Faktor und Thermonuklease. Alle *S. aureus* waren empfindlich gegenüber den Antibiotika Tetracyclin, Minocyclin, Erythromycin und Sulfamethoxazol/Trimethoprim. Resistenzen bzw. ein intermediäres Verhalten trat bei einigen Isolaten gegenüber Penicillin G, Cefoperazon, Gentamicin, Clindamycin und Enrofloxacin auf.

Eine molekulare Identifizierung der Kulturen erfolgte durch Polymerasekettenreaktion (PCR)-gestützten Nachweis eines *S. aureus*-spezifischen Abschnitts des 23S rRNA-Gens, der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region (ISR), eines weiteren *S. aureus*-spezifischen chromosomalen Genabschnitts und durch Nachweis der für *S. aureus*-typischen Gene *clfA* (Clumping-Faktor), *nuc* (Thermonuklease), *coa* (Koagulase) und *spa* (Protein A). Die ISR und die Gene *coa* und *spa* wiesen Größenpolymorphismen auf. In weiteren Untersuchungen wurden die *S. aureus*-Kulturen hinsichtlich des Vorkommens von Toxingenen untersucht. Dies erfolgte ebenfalls mittels PCR, der Nachweis der Staphylokokkenenterotoxine SEA bis SEE in parallel durchgeführten Untersuchungen mit einem kommerziellen Testsystem. Durch die PCR-Analysen konnten bei zahlreichen Kulturen die häufig gemeinsam auftretenden Gene *sec* (72 %) und *tst* (62 %), ferner vereinzelt die Toxingene *seg* (15 %) und *sei* (11 %), nicht aber die Toxingene *sea*, *seb*, *sed*, *see*, *seh*, *sej*, *eta* und *etb* nachgewiesen werden. Der PCR-vermittelte Nachweis von *sec* korrespondierte bei der überwiegenden Zahl der Kulturen mit der Expression von SEC. Die aufgeführten pheno- und genotypischen Untersuchungsmethoden ermöglichten eine eindeutige Identifizierung und weitergehende Charakterisierung der *S. aureus*-Isolate von Schaf und Ziege.

Das im vorliegenden festgestellte vermehrte Auftreten der Toxingene *sec* und *tst*, bzw. der entsprechenden Toxine, könnte mit dem größtenteils schweren Verlauf von *S. aureus*-Infektionen bei beiden Tierarten im Zusammenhang stehen.

## 7. Summary

In the present study 47 *S. aureus*-cultures, 42 cultures isolated from sheep and five cultures isolated from goats, were identified and further characterized by their cultural, biochemical and molecular properties.

All strains grew on media selective for staphylococci, showed a typical hemolysis as well as a yellow to orange pigmentation and displayed the *S. aureus*-specific properties coagulase, clumping-factor and thermonuclease. All strains were susceptible to the antibiotic substances tetracycline, minocyclin, erythromycin and sulfamethoxazol/trimethoprim. Some isolates showed a resistance or an intermediate response towards penicillin G, cefoperazon, gentamicin, clindamycin and enrofloxacin.

A molecular identification of the *S. aureus*-cultures was performed by polymerase chain reaction (PCR)-mediated detection of a *S. aureus*-specific part of the 23S rRNA-gene, the 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-region (ISR), of another *S. aureus*-specific chromosomal gene-part and by PCR-amplification of the *S. aureus*-specific genes *clfA* (clumping-factor), *nuc* (thermonuclease), *coa* (coagulase) and *spa* (protein A). The ISR and the genes *coa* and *spa* displayed size polymorphisms. The enterotoxin genes *sea-sej* and *tst* of the *S. aureus*-strains were also investigated by PCR, the production of the staphylococcal enterotoxins SEA to SEE in parallel by a commercial test-system. The most commonly identified toxin genes were *sec* (72 %) and *tst* (62 %), frequently occurring in combination. Some strains were positive for *seg* (15 %) or *sei* (11 %), none of the strains was positive for *sea*, *seb*, *sed*, *see*, *seh*, *sej*, *eta* and *etb*. The PCR-mediated detection of *sec* generally corresponded with the expression of SEC.

The frequent occurrence of the enterotoxin genes *sec* and *tst* and their corresponding toxins, respectively might be related to the commonly severe character of *S. aureus*-infections in both animal species. The presented pheno- and genotypical methods allowed a clear identification and further characterization of the *S. aureus*-strains isolated from sheep and goats.



**8. Literaturverzeichnis**

- AB, J., Y. C. ITO, M. ONIMARU, T. KOHSAKA, und T. TAKEDA (2000): Characterization and distribution of a new enterotoxin-related superantigen produced by *S. aureus*. Microbiol. Immunol. 44, 79-88
- ABRAMSON, C. (1972): Staphylococcal Enzymes. In: The staphylococci. Hrsg.: Cohen, J. O. Wiley-Interscience, New York
- ABRAMSON, C. und H. FRIEDMAN (1969): Electrophoretic characteristics of staphylococcal hyaluronate lyase. J. Bacteriol. 97, 715-718
- ADESIYUN, A. A., W. LENZ und K. P. SCHAAL (1992): Production of toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) by *S. aureus* strains isolated from humans, animals and foods in Nigeria. Microbiol. 15, 125-133
- AFSETH, G., Y.-Y. MO und L. P. MALLAVIA (1995): Characterization of the 23S and 5S rRNA genes of *Coxiella burnetti* and identification of an intervening sequence within the 23S rRNA gene. J. Bacteriol. 177, 2946-2949
- AKINEDEN, O., C. ANNEMÜLLER, A. A. HASSAN, C. LÄMMLER, W. WOLTER und M. ZSCHÖCK (2001): Toxin genes and other characteristics of *S. aureus* isolates from milk of cows with mastitis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8, 959-964
- ANFENSEN, C. B., P. CUATRECASAS und H. TANIUCHI (1971): Staphylococcal nuclease, chemical properties and catalysis. In: The Enzymes. Vol. 4., 177-204. Hrsg.: Boyer, N. Academic Press, New York
- ANNEMÜLLER, C. (1999): Identifizierung und weitergehende Charakterisierung von Bakterien der Gattung *Staphylococcus*, isoliert von Vögeln der Ordnung Psittaciformes und Passeriformes. Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen

- ARBUTHNOTT, J. P., D. C. COLEMAN und J. S. De AZAVEDO (1990): Staphylococcal toxins in human disease. J. Appl. Bacteriol. Sympos. Suppl., 101-107
- ARVIDSON, S. O. (1983): Extracellular enzymes from *S. aureus*. In: Staphylococci and staphylococcal infections, Vol. 2., 745-808, Hrsg.: Easmon, C. S. F. und C. Adlam, Academic Press, London, New York
- BAIRD-PARKER, A.-C. (1962): An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. J. Appl. Bact. 25, 12-19
- BALABAN, N. und A. RASOOLY (2000): Rev.: Staphylococcal enterotoxins. Intern. J. Food Microbiol. 61, 1-10
- BEHRENS, H. (1987): Lehrbuch der Schafkrankheiten; 3. Auflage. Hrsg.: Behrens, H., Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg
- BEHRENS, H., M. GANTER und T. HIEPE (2001): Lehrbuch der Schafkrankheiten; 4. Auflage. Hrsg.: Ganter, M., Paul Parey Buchverlag, Berlin
- BENNET, R. W. (1992): The biomolecular temperament of staphylococcal enterotoxin in thermally processed foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. 75, 6-12
- BERGDOLL, M. S. (1989): *S. aureus*. In: Foodborne bacterial pathogens. 463-523. Hrsg. Doyle, M. P., M. Dekker, Inc., New York und Basel
- BETLEY, M. J. und J. J. MEKALANOS (1988): Nucleotide Sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. J. Bacteriol. 170, 34-41
- BHAKDI, S. und J. TRANUM-JENSEN (1991):  $\alpha$ -toxin of *S. aureus*. Microbiol. Rev. 55, 733-751
- BLACKSTOCK, R., R. M. HYDE und F. C. KELLY (1968): Inhibition of fibrinogen reaction by polysaccharide of encapsulated *S. aureus*. J. Bacteriol. 96, 799-803

- BOCKLISCH, H. und D. WETZSTEIN (1994): Klinische, labordiagnostische und therapeutische Untersuchungen zur Mastitis in einem großen Schafzuchtbestand. Tierärztliche Praxis 22, 524-528
- BOCKLISCH, H. und H. WORBES (1993): Bacteriological investigations of the ovine mastitis. Poster im Rahmen der: Third International Sheep Veterinary Conference "Science Serving Sheep", Edingburgh
- BOERLIN, P. und J. NICOLET (2002): Grampositive Kokken, aus dem Kompendium der Veterinärmedizinischen Bakteriologie 2002, 9. Kapitel. Institut der Veterinär-Bakteriologie, Universität Bern
- BOHACH, G. A. und P. M. SCHLIEVERT (1987): Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. Mol. Gen. Gent. 209, 15-21
- BOSTEDT, H. und K. DEDIÉ (1996): Schaf und Ziegenkrankheiten, 2. Auflage, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart
- BOYLE, M. D. P. (1990): Bacterial immunoglobulin-binding proteins. Vol. 1: Microbiology, chemistry and biology. Vol. 2: Applications in Immunotechnology. Academic Press, Inc., San Diego, New York
- BRAKSTAD, O. G. und J. A. MAELAND (1997): Mechanisms of methicillin resistance in staphylococci. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 105, 264-276
- BRAKSTAD, G., K. AASBAKK und J. A. MAELAND (1992): Detection of *S. aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. J. Clin. Microbiol. 30, 1654-1660
- BRANDER, G. C., D. M. PUGH, R. J. BYWATER und W. L. JENKINS (1991): Veterinary applied pharmacology & therapeutics, 5. Auflage. Hrsg.: Saunders, W. B., Baillière Tindall, London

- BRÜCKLER, J., S. SCHWARZ und F. UNTERMANN (1994): Staphylokokken-Infektionen und -Enterotoxine; Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Band II/Teil1 2. Auflage. Hrsg: Blobel, H. und T. Schließer. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart
- BRUNNER, H., C. G. GEMMEL, H. HUSER und F.-J. FEHRENBACH (1981): Chemical and biological properties of *S. aureus* lipase. In: Staphylococci and staphylococcal infections. Hrsg. J. Jeljascewicz. Zbl. Bakt. Suppl. 10, 329-333. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- CADNESS-GRAVES, B., R. WILLIAMS, G. HARPER und A. A. MILES (1943): Slide-test for coagulase-positive staphylococci. Lancet 1, 736-738
- CHAPMAN, G. H. (1945): The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. J. Bacteriol. 50, 201-203
- CHEN, T.-R., M.-H. HSIAO, C.-S. CHIOU und H.-Y. TSEN (2001): Development and use of PCR primers for C1, C2 and C3 enterotoxin types of *S. aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. Int. J. Food Microbiol. 71, 63-70
- CLYNE, M., T. H. BIRKBECK und J. P. ARBUTHNOTT (1992): Characterization of staphylococcal  $\gamma$ -lysin. J. Gen. Microbiol. 138, 923-930
- COUCH, J. L. und M. J. BETLEY (1989): Nucleotide sequences of the type C3 staphylococcal enterotoxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation. J. Bacteriol. 171, 4507-4510
- CUNNINGHAM, L., B. W. CALVIN und M. PRVIAT de GARILHE (1956): A desoxyribonuclease of *Micrococcus pyogenes*. J. Am. Chem. Soc. 78, 4642-4645
- DAGHISTANI, I. H, A. A. ISSA und A. A. SHEHABI (2000): Frequency of nasal and wound isolates of *S. aureus* associated with TSST-1 production in Jordanian population. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 27, 95-98

- DAHME, E. und E. WEISS (1999): Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. 5. Auflage, Hrsg.: Dahme E. und E. Weiss. Enke Verlag, Stuttgart
- DAJANI, A. S. (1972): The scaled-skin syndrome: Relation to phage-group II staphylococci. J. Infect. Dis. 125, 548-551
- DE CENTORBI, O. N., A. M. DE CUADRADO, S. C. DE CARIZZO, M. C. DE MILAN, D. F. GIMENEZ und M. S. BERGDOLL, (1988): Prevalence and characterization of *S. aureus* in young goats. Am. J. Vet. Res. 49, 1494-1496
- DINGES, M. M., P. M. ORWIN und P. M. SCHLIEVERT (2000): Exotoxins of *S. aureus*. Clin. Microbiol. Rev. 13, 16-34
- DUTHIE, E. S. (1954): Evidence of two forms of staphylococcal coagulase. J. Gen. Microbiol. 10, 427-436
- DYKE, K. und P. GREGORY (1997): Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. Resistance mediated by  $\beta$ -lactamase. In: The staphylococci in human disease 139-157. Hrsg.: Crossley, K. B. und G. L. Archer, Churchill Livingstone, New York
- EDWARDS, V. M., J. R. DERINGER, S. D. CALLANTINE, C. F. DEOBALD, P. H. BERGER, V. KAPUR, C. V. STAUFFACHER und G. A. BOHACH (1997): Characterization of the canine type C enterotoxin produced by *S. intermedius* pyoderma isolates. Infect. Immun. 65, 2346-2352
- ELEK, S. D. und E. LEVY (1950): Distribution of hemolysins in pathogenic and non-pathogenic staphylococci. J. Pathol. Bacteriol. 62, 541-554
- EYERS, M., S. CHAPELLE, G. VAN CAMP, H. GOOSSENS und R. DE WACHTER (1993): Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by polymerase chain reaction amplification of 23S rRNA gene fragments. J. Clin. Microbiol. 31, 3340-3343

- FITTON, S. E., D. F. HUNT, J. MARASCO, J. SHABANOWITZ, S. WINSTON und A. DELL (1984): The amino acid sequence of delta hemolysin purified from a canine isolate of *S. aureus*. FEBS Lett. 169, 25-29
- FITZGERALD, J. R., S. R. MONDAY, T. J. FOSTER, G. A. BOHACH, P. J. HARTIGAN, W. J. MEANEY und C. J. SMYTH (2001): Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *S. aureus* encoding multiple superantigens. J. Bacteriol. 183, 63-70
- FORSMAN, P. , A. TILSALA-TIMISJÄRVI und T. ALATOSSAVA (1997): Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. Microbiol. 143, 3491-3500
- FRÉNAY, H. M. E., A. E. BUNSCHOTTEN, L. M. SCHOULS, W. J. VAN LEEUWEN, C. M. J. E. VANDENBROUCKE-GRAULS, J. VERHOEF und F. R. MOOI. (1996): Molecular typing of methicillin-resistant *S. aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. Europ. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15, 60-64
- FRÉNAY, H. M. E., J. P. G. THEELEN, L. M. SCHOULS, C. M. J. E. VANDENBROUCKE-GRAULS, J. VERHOEF, W. J. VAN LEEUWEN und F. R. MOOI (1994): Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *S. aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. J. Clin. Microbiol. 32, 846-847
- FRITSCHKE, D. (1970): Untersuchungen zur Funktion des  $\beta$ -Hämolysins von *S. aureus*. Zbl. Bakt. Hyg. I. Orig. 213, 348-355
- GEORGE, R., L. BALL und P. NORBURY (1990): Susceptibility to ciprofloxacin of nosocomial gram-negative bacteria with staphylococci isolated in the U. K. J. Antimicrob. Chemotherapie (Supplement F) 26, 145-156
- GOGOV, I., T. PEEVA und G. SLAVCHEV (1984): Enterotoxigenic staphylococci in the milk of cows and sheep with mastitis. Vet. Med. Nauki, 21, 86-92

- GOH, S. H., S. K. BYRNE, J. L. ZHANG und A. W. CHOW (1992): Molecular typing of *S. aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. J. Clin. Microbiol. 30, 1642-1645
- GRÄFE, U. (1992): Biochemie der Antibiotika: Struktur-Biosynthese-Wirkmechanismus. Hrsg. Gräfe, U. Spektrum, Akad. Verlag Heidelberg, Berlin, New-York
- GUYONNET, F., M. PLOMMET und C. BOUILLANNE (1968): Purification de l'hémolysine  $\gamma$  de *S. aureus*. C. R. Acad. Sci. 267, 1180-1182
- HAKANSSON, M., K. PETERSSON, H. NILSSON, G. FORSBERG, P. BJORK, P. ANTONSSON und L. A. SVENSSON (2000): The crystal structure of staphylococcal enterotoxin H: implications for binding properties to MHC class II and TcR molecules. J. Mol. Biol. 302, 527-537
- HALLANDER, H. O. (1963): Fractionation of staphylococcal toxins by gelfiltration. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 59, 543-552
- HARLAND, N. M., J. A. LEIGH und M. D. COLLNS (1993): Development of gene probes for the specific identification of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* based upon large subunit rRNA gene sequences. J. Appl. Bacteriol. 74, 526-531
- HARSHMAN, S., P. BOQUET, E. DUFLLOT, J. E. ALOUF, C. MONTECUCCO und E. PAPINI (1989): Staphylococcal  $\alpha$ -toxin: a study of membrane penetration and pore formation. J. Biol. Chem. 264, 14978-14984
- HASSAN, A. A. (2002): Nachweis und weitergehende Analyse von speziesspezifischen Genabschnitten zur molekularen Charakterisierung einiger Mastitiserreger vom Rind. Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.

- HEINS, J. N., J. R. SURIANO, H. TANIUCHI und C. B. ANFINSEN (1967): Characterization of nuclease produced by *S. aureus*. J. Biol. Chem. 242, 1016-1020
- HÉRBERT, G. A. und G. A. HANCOCK (1985): Synergistic hemolysis exhibited by species of staphylococci. J. Clin. Microbiol. 28, 2425-2431
- HO, G., W. H. CAMPBELL, M. S. BERGDOLL und E. CARLSON (1989a): Production of a toxic shock syndrome variant by *S. aureus* strains associated with sheep, goats and cows. J. Clin. Microbiol. 27, 1946-1948
- HO, G., W. H. CAMPBELL und E. CARLSON (1989b): Ovine-associated *S. aureus* protein with immunochemical similarity to toxic shock syndrome toxin-1. J. Clin. Microbiol. 27, 210-212
- HOOKEY, J., J. F. RICHARDSON und B. D. COOKSON (1998): Molecular typing of *S. aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. J. Clin. Microbiol. 36, 1083-1089
- HOVDE, C. J., S. P. HACKETT und G. A. BOHACH (1990): Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C3 gene: sequence comparison of all three type C staphylococcal enterotoxins. Mol. Gen. Genet. 220, 329-333
- JARRAUD, S., G. COZON, F. VANDENESCH, M. BES, J. ETIENNE und G. LINA (1999): Involvement of enterotoxin G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. J. Clin. Microbiol. 37, 2446-2449
- JARRAUD, S., M. A. PEYRAT, A. LIM, A. TRISTAN, M. BES, C. MOUGEL, F. ETIENNE VANDENESCH, M. BONNEVILLE und G. LINA (2001): egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *S. aureus*. J. Immunol. 166, 669-677
- JEFFRIES, C. D., D. F. HOLTMAN und D. G. GUSE (1957): Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acid. J. Bacteriol. 73, 590-591



- JOHNSON, A. D., J. F. METZGER und L. SPERO (1975): Production, purification and chemical characterization of *S. aureus* exfoliative toxin. Infect. Immun. 12, 1206-1210
- JOHNSON, W. M. S., S. D. TYLER, E. P. EWAN, F. E. ASHTON, D. R. POLLERD und K. R. ROZEE (1991): Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin-1 in *S. aureus* by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 29, 426-430
- JONSSON, P., M. LINDBERG, I. HARALDSSON und T. WADSTRÖM (1985): Virulence of *S. aureus* in a mouse mastitis model: studies of  $\alpha$ -hemolysin, coagulase, and protein A as possible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning. Infect. Immun. 49, 765-769
- KAIDA, S., T. MIYATA, Y. YOSHIZAWA, H. S., IGARASHI, und S. IWANAGA (1989): Nucleotide and deduced amino acid sequences of staphylocoagulase gene from *S. aureus* strain 213. Nucl. Acids Res. 17, 8871
- KAWABATA, S., T. MORITA, T. MIYATA, S. IWANAGA und H. IGARASHI (1986): Isolation and characterization of staphylocoagulase chymotryptic fragment. J. Biol. Chem. 261, 1427-1433
- KLOOS, W. E. und K. H. SCHLEIFER (1986): In: Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Volume 2, Bergey's Manual, Senath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G., Hersgb. J. P. Butler. Williams und Wilkins Verlag, Baltimore
- KONDO, I., S. SAKURAI und J. SARAI (1974): New type of exfoliatin obtained from staphylococcal strains belonging to phage groups other than group II, isolated from patients with impetigo and Ritter's disease. Infect. Immun. 10, 851-861
- KONKEL, M. E., R. T. MARCONI, D. J. MEAD und W. JR. CIEPLAK (1994): Identification and characterization of an intervening sequence within the 23S ribosomal RNA genes of *Campylobacter jejuni*. Mol. Microbiol. 14, 235-241

- KORNBLUM, J., B. N. KREISWIRTH, S. J. PROJAN, H. ROSS und R. P. NOVICK (1990): *Agr*: polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *S. aureus*. In: Molecular biology of the staphylococci 373-402. Hrsg.: Novick, R. VCH Publisher, Inc. New York
- KROKER, R. (1997): In: Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. 3. Auflage. Hrsg.: Löscher, W., F. R. Ungemach und R. Kroker. Parey Verlag, Berlin
- KRONVALL, G., R. P. MESSNER und R. C. jr. WILLIAMS (1970): Immunochemical studies on the interaction between staphylococcal protein A and  $\gamma$ G globulin. J. Immunol. 105, 1353-1359
- LACHICA, R. V. F. (1976): Simplified thermonuclease test for rapid identification of *S. aureus* recovered on agar media. Appl. Environm. Microbiol. 32, 633-634
- LÄMMLER, CH. (1983): Vergleichende Untersuchungen von Fibrinogenrezeptoren an Bakterien unter besonderer Berücksichtigung pathogener Streptokokken. Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen
- LÄMMLER, CH. und H. BLOBEL (1985): Plasmaproteinbindung bei Gram-positiven Kokken. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 98, 365-368
- LÄMMLER, CH. und H. BLOBEL (1987): Synergistische und antagonistische hämolytische Reaktionen bakterieller Proteine. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 100, 95-99.
- LÄMMLER, C., P. SCHAUFUß, K. GORETZKI und H. BLOBEL (1986): Screening for bacterial Fc-receptor activity on nitrocellulose membranes. J. Immunol. Meth. 90, 47-50
- LAFI, S. Q., A. M. AL-MAJALI, M. D. ROUSAN und J. M. ALAWNEH (1998): Epidemiological studies of clinical and subclinical ovine mastitis in Awassi sheep in northern Jordan. Prev. Vet. Med. 33, 171-181

- LAUDE, G. (2000): Ratgeber Infektionskrankheiten, Robert Koch-Institut, Berlin. In: Epidemiol. Bulletin 8, 61-65
- LEE, P. K., B. N. KREISWIRTH, J. R. DERINGER, S. J. PROJAN, W. EISNER, B. L. SMITH, E. CARLSON, R. P. NOVICK und P. M. SCHLIEVERT (1992): Nucleotide sequences and biologic properties of toxic shock syndrome toxin-1 from ovine- and bovine-associated *S. aureus*. J. Infect. Dis. 165, 1056-1063
- LINDMARK, R., J. MOVITZ und J. SJÖQUIST (1977): Extracellular protein A from a methicillin resistant strain of *S. aureus*. Eur. J. Biochem. 74, 623-628
- LINDSAY, J. A., A. RUZIN, H. F. ROSS, N. KUREPINA und R. P. NOVICK (1998): The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *S. aureus*. Mol. Microbiol. 29, 527-543
- LOEB, L. (1903): The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood. J. Med. Res. 10, 407-419
- MARR, J. C., J. D. LYON, J. R. ROBERSON, M. LUPHER, W. C. DAVIS und G. A. BOHACH (1993): Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. Infect. Immun. 61, 4254-4262
- MARTINEAU, F., F. J. OICARD, P. H. ROY, M. OUELLETTE und M. G. BERGEROU (1998): Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *S. aureus*. J. Clin. Microbiol. 36, 618-623
- MATTSON, E., H. VAN DIJK, R. N. VERHOFF und J. ROLLOF (1996): Supernatants from *Staphylococcus epidermidis* grown in the presence of different antibiotics induce differential release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes. Infect. Immun. 64, 4351-4355
- McCARTNEY, C. A. und J. P. ARBUTHNOTT (1978): Mode of action of membrane damaging toxins and cell membranes, 98-127. Hrsg.: Wadström, T. und J. Jeljaszewicz. Academic Press Inc., London

- McCORMICK, J. K., J. M. YARWOOD und P. M. SCHLIEVERT (2001): Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: An update. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 77-104
- McDEVITT, D., P. FRANCOIS, P. VAUDAUX und T. J. FOSTER (1994): Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *S. aureus*. *Mol. Microbiol.* 11, 237-248
- McDEVITT, D., P. VAUDAUX und T. J. FOSTER (1992): Genetic evidence that bound coagulase of *S. aureus* is not clumping factor. *Infect. Immun.* 60, 1514-1523
- MELLOR, I. R., D. H. THOMAS und M. S. P. SANSOM (1988): Properties of iron channels formed by *S. aureus*  $\delta$ -toxin. *Biochim. Biophys. Acta* 942, 280-294
- MIFLIN, J. K. und P. J. BLACKALL (2001): Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 216-221
- MÖLLBY, R. (1983): Isolation and properties of membrane damaging toxins. In: *Staphylococci and staphylococcal infections* 2, 619-669. Hrsg.: Easmon, C. S. F. und C. Adlam. Academic Press, London, New York
- MOLLER, K., J. S. AGERHOLM, P. AHRENS, N. E. JENSEN und T. K. NIELSEN (2000): Abscess disease, caseous lymphadenitis, and pulmonary adenomatosis in imported sheep. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 47, 55-62
- MONDAY, S. R. und G. A. BOHACH, (1999a): Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3411-3414

- MONDAY, S. R. und G. A. BOHACH (1999b): Properties of *S. aureus* enterotoxins and toxic shock syndrom toxin-1. In: The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins, Hrsg. J. F. Alouf und J. H. Freer, Academic Press., London
- MOREILLON, P., J. M. ENTENZA, P. FRANCIOLI, D. McDEVITT, T. J. FOSTER, P. FRANÇOIS und P. VAUDAUX (1995): Role of *S. aureus* coagulase und clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. Infect. Immun. 63, 4738-4743
- MUCH, H. (1908): Über eine Vorstufe des Fibrinfermentes in Kulturen von *S. aureus*. Bioch. Zeitschr. 14, 143-155
- MÜLLER, CH. (1993): Charakterisierung von Staphylokokken aus Mastitisproben der Region Nordostschweiz. Vet. med. Diss., Zürich
- MUNSON, S. H., M. T. TREMAINE, M. J. BETLEY und R. A. WELCH (1998): Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *S. aureus*. Infect. Immun. 66, 3337-3348
- MYRICK, B. A. und P. D. ELLNER (1982): Evaluation of the latex slide agglutination test for identification of *S. aureus*. J. Clin. Microbiol. 15, 275-277
- NAIDU, A. S., J. MIEDZOBRODZKI, M. ANDERSSON, L.-E. NILSSON, A. FORSGREN und J. L. WATTS (1990): Bovine lactoferrin binding to six species of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. J. Clin. Microbiol. 28, 2312-2319
- NAÏMI, A., G. BECK, M. MONIQUE, G. LEFEBVRE und C. BRANLANTI (1999): Determination of the nucleotide sequence of the 23S ribosomal RNA and flanking spacers of an *Enterococcus faecium* strain, reveals insertion-deletion events in the ribosomal spacer 1 of enterococci. Syst. Appl. Microbiol. 22, 9-21
- NI EIDHIN, D., S. PERKINS, P. FRANCOIS, P. VAUDAUX, M. HOOK und T. J. FOSTER, (1998): Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *S. aureus*. Mol. Microbiol. 30, 245-57

- NILSSON, H., P. BJORK, M. DOHLSTEN und P. ANTONSSON (1999): Staphylococcal enterotoxin H displays unique MHC class II-binding properties. *J. Immunol.* 163, 6686-6693
- OBERDISSE, E., E. HACKENTHAL und K. KUSCHINSKY (1997): *Pharmakologie und Toxikologie*. Hrsg.: Kuschinsky, K. Springer Verlag, Berlin
- ORDEN, J. A., D., CID, M. E. BLANCO, J. A. RUIZ SANTA QUITERA, E. GOMEZ-LUCIA und R. de la FUENTE (1992a): Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production by staphylococci isolated from mastitis in sheep. *APMIS* 100, 132-134
- ORDEN, J. A., J. GOYACHE, J. HERNANDEZ, A. DOMENECH, G. SUAREZ und E. GOMEZ-LUCIA (1992b): Detection of enterotoxins and TSST-1 secreted by *S. aureus* isolated from ruminant mastitis. Comparison of ELISA and immunoblot. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 486-489
- ORWIN, P. M., D. Y. LEUNG, H. L. DONAHUE, R. P. NOVICK und P. M. SCHLIEVERT, (2001): Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect. Immun.* 69, 360-366
- OTERO, A., M. L. GACÍA, B. MORENO und M. S. BERGDOLL (1990): Production of staphylococcal enterotoxins C1 and C2 and thermonuclease throughout the growth cycle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 555-559
- PALLASKE, G. (1960): *Pathologische Histologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena
- PAPASIAN, C. J. und B. GARRISON (1999): Evaluation of a rapid slide agglutination test for identification of *S. aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 201-203
- PARK, P. W., D. D. ROBERTS, L. E. GROSSO, W. C. PARKS, J. ROSENBLOOM, W. R. ABRAMS und R. P. MECHAM (1991): Binding of elastin to *S. aureus*. *J. Biol. Chem.* 266, 23399-23406

- PARKER, M. T. (1958): Some cultural characteristics of *S. aureus* strains from superficial skin infections. J. Hyg. (Camb.) 56, 238-253
- PAULSSON, M., O. D. LIANG, F. ASCENCIO und T. WADSTRÖM (1992a): Vitronectin-binding surface proteins of *S. aureus*. Zbl. Bakt. 277, 54-64
- PAULSSON, M., A. LJUNGH und T. WADSTRÖM (1992b): Rapid identification of fibronectin, vitronectin, laminin and collagen cell surface binding proteins on coagulase-negative staphylococci by particle agglutination assays. J. Clin. Microbiol. 30, 2006-2012
- PETERSSON, K., M. HAKANSSON, H. NILSSON, G. FORSBERG, L. A. SVENSSON, A. LILJAS und B. WALSE (2001): Crystal structure of a superantigen bound to MHC class II displays zinc and peptide dependence. EMBO J. 20, 3306-3312
- PIÉMONT, Y. (1999): Staphylococcal epidermolytic toxins: structure, biological and pathophysiological properties. In: The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. Hrsg. J. E. Alouf und J. H. Freer, Academic Press., London
- PREUSS, H. R., G. J. SUNDAY, V. I. HARASZTHY und J. J. ZAMBON (1992): Rapid identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* based on analysis of 23S ribosomal RNA. Microbiol. Immunol. 7, 372-375
- RAUTELA, G. S. und C. ABRAMSON (1973): Crystallization and partial characterization of *S. aureus* hyaluronate lyase. Arch. Biochem. Biophys. 158, 687-694
- RECSEI, P., B. KREISWIRTH, M. O'REILLY, P. SCHLIEVERT, A. GUSS und R. NOVICK (1985): Regulation of exoprotein gene expression by *agr*. Mol. Gen. Genet. 202, 58-61

- REN, B. K., J. D. BANNAN, V. PANCHOLI, A. L. CHEUNG, J. C. ROBBINS, V. A. FISCHETTI und J. B. ZABRISKIE (1994): Characterization and biological properties of a new staphylococcal enterotoxin. *J. Exp. Med.* 180, 1675-1683
- ROGOLSKY, M. (1979): Nonenteric toxins from *S. aureus*. *Microbiol. Rev.* 43, 320-360
- ROLLE, M. und A. MAYR (1993): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen und Agrarwissenschaftler, 5. Auflage. Hrsg.: Mayr, A. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- ROSIN, H. (1996): Antibiotika und Chemotherapeutika, Antiinfektiöse Therapie. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 6. Auflage. Hrsg.: Forth, W. und D. Henschler, W. Rummel und K. Starke. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- ROTTER, J. und F. C. KELLY (1966): Serological reactions associated with the clumping factor of *S. aureus*. *J. Bacteriol.* 91, 588-594
- RYDEN, C., K. RUBIN, P. SPEZIALE, M. HÖÖK, M. LINDENBERG und T. WALDTRÖM (1983): Fibronectin receptors from *S. aureus*. *J. Biol. Chem.* 258, 3396-3401
- SALLEN, B., A. RAJOHARISON, S. DESVARENNE, F. QUINN und C. MABILAT (1996): Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 669-674
- SCHAD, E. M., A. C. PAPAGEORGIOU, L. A. SVENSSON, und K. R. ACHARYA (1997): A structural and functional comparison of staphylococcal Enterotoxins A and C2 reveals remarkable similarity and dissimilarity. *J. Mol. Biol.* 269, 270-280
- SCHADEWINKEL-SCHERKL und R.A.-M., SCHERKL (1995): Antibiotika und Chemotherapeutika in der tierärztlichen Praxis: Pharmakologische Daten und



klinische Anwendung. Hrsg.: Schadewinkel-Scherkl, A.-M. und R. Scherkl.  
Gustav Fischer Verlag, Jena

SCHEIFELE, D. W., G. L. BJORNSEN, R. A. DYER und J. E. DIMMICK (1987):  $\delta$ -like toxin produced by coagulase-negative staphylococci is associated with neonatal necrotizing enterocolitis. *Infect. Immun.* 55, 2268-2273

SCHLEIFER, K. H. (1986): Gram-positive cocci. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Gram-positive cocci. 9. Auflage. Hrsg.: Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe und J. G. Holdt, Williams and Wilkins Verlag, Baltimore

SCHLEIFER, K. H. und W. E. KLOOS (1994): In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. *Bergey's Manual*, 9. Auflage. Hrsg.: Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, S. T. Williams und W. R. Hensley, Williams und Wilkins Verlag, Baltimore

SCHMITZ, F. J., K.-E. VELDKAMP, K. P. M. VAN KESSEL, J. VERHOEF und J. A. G. VAN STRIJP (1997c): Delta-toxin from *S. aureus* as a costimulator of human neutrophil oxidative burst. *J. Infect. Dis.* 176, 1531-1535

SCHMITZ, F. J., M. STEIERT, H. V. TICHY, B. HOFMANN, J. VERHOEF, H. P. HEINZ, K. KÖHRER und E. JONES (1998): Typing of methicillin-resistant *S. aureus* isolated from Düsseldorf by six genotypic methods. *J. Med. Microbiol.* 47, 341-351

SHOPSIN, B., M. GOMEZ, S. O. MONTGOMERY, D. H. SMITH, M. WADDINGTON, D. E. DODGE, D. A. BOST, M. RIEHMAN, S. NAIDICH und B. N. KREISWIRTH (1999): Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *S. aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 3556-3563

SKALKA, B. (1985): Hyaluronidase test in the diagnosis of staphylococci. *Vet. Med. (Praha)* 30, 373-378

- SKALKA, B., J. SMOLA und J. PILLICH: (1979): A simple method of detecting staphylococcal hemolysins. Zentralbl. Bakteriол. Hyg., I. Abt. Orig. A 245, 283-286
- SKURNIK, M. und P. TOIVANEN, (1991): Intervening sequences (IVSs) in the 23S ribosomal RNA genes of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. The IVSs in *Y. enterocolitica* and *Salmonella typhimurium* have a common origin. Mol. Microbiol. 5, 585-593
- SJÖQUIST, J., B. MELOUN und H. HJELM, (1972a): Protein A isolated from *S. aureus* after digestion with lysostaphin. Eur. J. Biochem. 29, 572-578
- SJÖQUIST, J., J. MOVITZ, I. B. JOHANSSON und H. HJELM (1972b): Localization of Protein A in the bacteria. Eur. J. Biochem. 30, 190-194
- STEPHAN, R., U. DURA und F. UNTERMANN (1999): Resistenzsituation und Enterotoxinbildungsfähigkeit von *S. aureus*-Stämmen aus bovinen Mastitismilchproben. Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene der Universität Zürich. Schweiz. Arch. Tierheilkd. 141, 287-290
- STEPHAN, R., C. ANNEMÜLLER, A. A. HASSAN und CH. LÄMMLER (2001): Characterization of enterotoxigenic *S. aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. Vet. Microbiol. 78, 373-382
- STRAUB, J. A., C. HERTEL und W. P. HAMMES (1999): A 23S rDNA-target polymerase chain reaction-based system for detection of *S. aureus* in meat starter cultures and dairy products. J. Food Protect. 62, 1150-1156
- SU, Y.-C. und A. C. L. WONG (1995): Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin H. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1438-1443
- SULTANA, F., Y. KAWAMURA, X. G. HOU, S. E. SHU und T. EZAKI (1998): Determination of 23S rRNA sequences from members of the genus *Streptococcus* and characterization of genetically distinct organisms previously identified as

- members of the *Streptococcus anginosus* group. FEMS Microbiol. Lett. 158, 223-230
- SUPERSAC, G., G. PREVOST und Y. PIEMONT (1993): Sequencing of leucocidin R from *S. aureus* P 83 suggests that staphylococcal leucocidins and  $\gamma$ -hemolysins are members of a single, two-component family of toxins. Infect. Immun. 61, 580-587
- SVENSSON L. A., E. M. SCHAD, M. SUNDSTRÖM, P. ANTOSSE, T. KALLAND und M. DOHLSTEN (1997): Staphylococcal enterotoxins A, D, and E. Aus: Superantigens Molecular Biology, Immunology and Relevance to Human Disease. Hrsg.: Leung, D. Y., B. T. Huber und P. M. Schlievert. Marcel Dekker, Inc., New York
- SYNGE, B. A., F. M. M. SCOTT und D. C. MAC DOUGALL (1985): Dermatitis of the legs of sheep associated with *S. aureus*. Vet. Rec. 116, 459-460
- THELESTAM, M. (1983): Modes of membrane damaging action of staphylococcal toxins. In: Staphylococci and Staphylococcal Infections 705-744. Hrsg.: Easmon, C. S. F. und C. Adlam. Academic Press, London, New York
- TODD, J., M. FISHAUT, F. KAPRAL und T. WELCH (1978): Toxic-shock syndrome associated with phage-group I staphylococci. Lancet 2, 1116-1118
- TONDIS, A. (1974): Zur Pathologie der schweren Schaf- und Ziegenmastitis. Schweiz. Arch. Tierheilk. 116, 449-454
- TRÁVNÍČEK, M und F. FEDERICH (1994): Euterkrankheiten der kleinen Wiederkäuer. In: Euter- und Gesäugekrankheiten. Hrsg.: Wendt, K. Gustav Fischer Verlag, Jena und Stuttgart.
- TSEN, H. Y. und CHEN T. R. (1992): Use of the polymerase chain reaction for specific detection of type A, D and E enterotoxigenic *S. aureus* in foods. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37, 685-690

- TUCKER, P. W., E. E. HAZEN und F. A COTTON. (1978): Staphylococcal nuclease reviewed: a prototypic study in contemporary enzymology. I. Isolation, physical and enzymatic properties. *Mol. Cell. Biochem.* 22, 67-77
- UHLÉN, M., B. GUSS, B. NILSSON, S. GATENBECK, L. PHILIPSON und M. LINDBERG (1984): Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. *J. Biol. Chem.* 259, 1695-1702
- UNTERMANN, F. (1994): Staphylokokken-Enterotoxine. In: Staphylokokken-Infektionen und -Enterotoxine; Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Band II/Teil 1 2. Auflage. Hrsg: Blobel, H. und T. Schließer, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart
- USHIODA, H. T. TERAYAMA, S. SAKAI, H. ZEN-Yoji, M. NISHIWAKI und A. HIDANO (1981): Coagulase typing of *S. aureus* and its application in routine work. In: Staphylococci and Staphylococcal Infections. *Zbl. Bakt. Suppl.* 10, 77-83. Hrsg.: Jeljaszewicz, J. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- USUI, Y. (1986): Biochemical properties of fibrinogen binding protein (clumping factor) of the staphylococcal cell surface. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 262, 287-297
- USUI, Y., T. OHTOMO und K. YOSHIDA (1985): Biochemical characterization of clumping factor extracted from a strain of *S. aureus*. In: The Staphylococci. *Zbl. Bakt. Suppl.* 14, 197-205. Hrsg.: Jeljaszewicz, J., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- VESTERBERG, O. (1968): Studies on extracellular proteins from *S. aureus*. III. Investigations on the heterogeneity of hyaluronate lyase using the method of isoelectric focusing. *Biochim. Biophys. Acta* 168, 218-227
- WADSTRÖM, T. (1983): Biological effects of cell damaging toxins. Staphylococci and staphylococcal infections. Vol. 2, Academic Press 671-704. Hrsg.: Easmon, C. S. F. und C. Adlam, London, New York

- WEISS, E. (1990): Haut. In: Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. 5. Auflage, Hrsg.: Dahme, E. und E. Weiss, Enke Verlag, Stuttgart
- WENK, K. und H. BLOBEL (1970): Untersuchungen an „Leukozidinen“ von Staphylokokken verschiedener Herkunft. Zbl. Bakt. Hyg., I. Referate 222, 139-151
- WHITE, E. C. und L. S. HINCKLEY (1999): Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. Small Rumin. Res. 33, 117-121
- WILKINSON, B. J. (1983): Staphylococcal capsules and slime. In: Staphylococci and staphylococcal infections. The organism in vivo and in vitro, Academic Press 481-523. Vol. 2, Hrsg.: Easmon, C. S. F. und C. Adlam., London, New York
- WINKLE, S. (1979): Mikrobiologische und serologische Diagnostik mit Berücksichtigung der Pathogenese und Epidemiologie, Gustav Fischer Verlag-Stuttgart, New York.
- WINTER, P. und W. BAUMGARTNER (1999): Evaluation of the California mastitis test (CMT) reaction in goat milk and its interpretation. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 106, 30-34
- WINTER P. und A. DEUTTZ (1998) Beitrag zur in vitro Antibiotikaempfindlichkeit von Mastitiserregern beim Rind. Schweiz. Arch. Tierheilk. 128, 401-406
- YERUHAM, I., S. PERL, D. ELAD und Y. AVIDAR (1999): A generalized staphylococcal scaled skin-like disease in lambs. Zentralbl. Veterinärmed. [B] 46, 635-640
- ZHANG, S., J. J. IANDOLO und G. C. STEWART (1998): The enterotoxin D plasmid of *S. aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). FEMS Microbiol. Lett. 168, 227-233

## Anhang 1

Sequenzvergleich der 9 Subtypen des *sec* Gens von *S. aureus* sowie die Ansatzstellen der von JOHNSON et al. (1991) beschriebenen Oligonukleotidprimer

1		59
1.	GAGAGCCAACCAGACCCTACGCCAGATGAGTTGCACAAAGCGAGTAAATTC	ACTGGTTT
2.	GAGAGCCAACCAGACCCTACGCCAGATGAGTTGCACAAAGCGAGTAAATTC	ACTGGTTT
3.	GAGAGTCAACCAGACCCTATGCCAGATGATTTGCACAAATCAAGTGAGTTT	ACTGGTAC
4.	GAGAGCCAACCAGACCCTACGCCAGATGAGTTGCACAAAGCGAGTAAATTC	ACTGGTTT
5.	-----CCTACGCCAGATGAGTTGCACAAATCAAGTGAGTTT	ACTGGTAC
6.	GAGAGTCAACCAGACCCTATGCCAGATGATTTGCACAAATCAAGTGAGTTT	ACTGGTAC
7.	GAGAGTCAACCAGACCCTATGCCAGATGATTTGCACAAATCAAGTGAGTTT	ACTGGTAC
8.	GAGAGTCAACCAGACCCTATGCCAGATGATTTGCACAAATCAAGTGAGTTT	ACTGGTAC
9.	GAGAGCCAACCAGACCCTACGCCAGATGAGTTGCACAAATCAAGTGAGTTT	ACTGGTAC
60		118
1.	GATGGAAAATATGAAAGTTT	TATATGATGATCGTTATGTATCAGCAACTAAAGTTAAGT
2.	GATGGAAAATATGAAAGTTT	TATATGATGATCGTTATGTATCAGCAACTAAAGTTAAGT
3.	GATGGGTAATATGAAATGTTT	TATATGATGATTATTATGTATCAGCAACTAAAGTTAAGT
4.	GATGGAAAATATGAAAGTTT	TATATGATGATCATTATGTATCAGCAACTAAAGTTAAGT
5.	GATGG-TAATATGAAATATTT	TATATGATGATCATTATGTATCAGCAACTAAAGTTATGT
6.	GATGGGTAATATGAAATATTT	TATATGATGATCATTATGTATCAGCAACTAAAGTTAAGT
7.	GATGGGTAATATGAAATATTT	TATATGATGATCATTATGTATCAGCAACTAAAGTTAAGT
8.	GATGGATAATATGAAATATTT	TATATGATGATCATTATGTATCAGCAACTAAAGTTAAGT
9.	GATGGGTAATATGAAATATTT	TATATGATGATCATTATGTATCAGCAACTAAAGTTAAGT
119		177
1.	CTGTAGATAAAATTTTTTGGCACATGATTTAATTTATAACATTAGTGATAAAAAA	ACTGAAA
1.	CTGTAGATAAAATTTTTTGGCACATGATTTAATTTATAACATTAGTGATAAAAAA	ACTGAAA
2.	CTGTAGATAAAATTTTTTGGCACATGATTTAATTTATAACATTAGTGATAAAAAA	ACTGAAA
3.	CTGTAGATAAAATTTTTTGGCACATGATTTAATTTATAACATTAGTGATAAAAAA	ACTGAAA
4.	CTGTAGATAAAATTTTTTGGCACATGATTTAATTTATAACATTAGTGATAAAAAA	ACTGAAA
5.	CTGTAGATAAAATTTTTTGGCACATGATTTAATTTATAACATTAGTGATAAAAAA	ACTGAAA
6.	CTGTAGATAAAATTTTTTGGCACATGATTTAATTTATAACATTAGTGATAAAAAA	ACTGAAA
7.	CTGTAGATAAAATTTTTTGGCACATGATTTAATTTATAACATTAGTGATAAAAAA	ACTGAAA
8.	CTGTAGATAAAATTTTTTGGCACATGATTTAATTTATAACATTAGTGATAAAAAA	ACTGAAA
178		236
1.	AATTATGACAAAGTGAAAAACAGAGTTATTAATGAAGATTTAGCAAAGAAGT	TACAAAGA
2.	AATTATGACAAAGTGAAAAACAGAGTTATTAATGAAGATTTAGCAAAGAAGT	TACAAAGA
3.	AACATATGACAAAGTGAAAAACAGAGTTATTAATGAAGATTTAGCAAAGAAGT	TACAAAGA
4.	AATTATGACAAAGTGAAAAACAGAGTTATTAATGAAGGTTTAGCAAAGAAGT	TACAAAGA
5.	AATTATGACAAAGTGAAAAACAGAGTTATTAATGAAGATTTAGCAAAGAAGT	TACAAAGA
6.	AACATATGACAAAGTGAAAAACAGAGTTATTAATGAAGATTTAGCAAAGAAT	TACAAAGA
7.	AATTATGACAAAGTGAAAAACAGAGTTATTAATGAAGATTTAGCAAAGAAGT	TACAAAGA
8.	AATTATGACAAAGTGAAAAACAGAGTTATTAATGAAGATTTAGCAAAGAAGT	TACAAAGA
9.	AATTATGACAAAGTGAAAAACAGAGTTATTAATGAAGATTTAGCAAAGAAAT	TACAAAGA

237		295
1.	TGAAGTAGTTGATGTGTATGGATCAAATTACTATGTAAACTGCTGTTTTTCATCCAAAG	
2.	TGAAGTAGTTGATGTGTATGGATCAAATTACTATGTAAACTGCTATTTTTTCATCCAAAG	
3.	TGAAGTAGTTGATGTATATGGATCAAATTACTATGTAAACTGCTATTTTTTCATCTAAAG	
4.	TGAAGTAGTTGATGTGTATGGATCAAATTACTATGTAAACTGCTATTTTTTCATCCAAAG	
5.	TGAAGTAGTTGATGTGTATGGATCAAATTACTATGTAAACTGCTATTTTTTCATCCAAAG	
6.	TGAAGTAGTTGATGTATATGGATCAAATTACTATGTAAACTGCTATTTTTTCATCCAAAG	
7.	TGAAGTAGTTGATGTGTATGGATCAAATTACTATGTAAACTGCTATTTTTTCATCCAAAG	
8.	TGAAGTAGTTGATGTGTATGGATCAAATTACTATGTAAACTGCTATTTTTTCATCCAAAG	
9.	TGAAGTAGTTGATGTGTATGGATCAAATTACTATGTAAACTGCTATTTTTTCATCCAAAG	
296		354
1.	ATAATGTAGGTAAAGTTACAGGTGGTAAAACTTGTATGTATGGAGGAATAACAAAACAT	
2.	ATAATGTAGGTAAAGTTACAGGTGGTAAAACTTGTATGTATGGAGGAATAACAAAACAT	
3.	ATAATGTTGGTAAGGTTACAGGTGGTAAAACTTGTATGTATGGAGGAATAACAAAACAT	
4.	ATAATGTAGGTAAAGTTACAGGTGGCAAAACTTGTATGTATGGAGGAATAACAAAACAT	
5.	ATAATGTAGGTAAAGTTACAGGTGGTAAAACTTGTATGTATGGAGGAATAACAAAACAT	
6.	ATAATGTAGGTAAAGTTACAAGTGGTAAAACTTGTATGTATGGAGGAATAACAAAACAT	
7.	ATAATGTAGGTAAAGTTACAGGTGGTAAAACTTGTATGTATGGAGGAATAACAAAACAT	
8.	ATAATGTAGGTAAAGTTACAGGTGGTAAAACTTGTATGTATGGAGGAATAACAAAACAT	
9.	ATAATGTAGGTAAAGTTACAGGTGGTAAAACTTGTATGTATGGAGGAATAACAAAACAT	
355		413
1.	GAAGGAAACCACTTTGATAATGGGAACTTACAAAATGTACTTATAAGAGTTTATGAAAA	
1.	GAAGGAAACCACTTTGATAATGGGAAATTACAAAATGTACTTATAAGAGTTTATGAAAA	
2.	GAAGGCAACCACTTTGATAATGGGAACTTACAAAATGTACTTATAAGAGTTTATGAGAA	
3.	GAAGGAAACCACTTTGATAATGGGAACTTACAAAATGTACTTATAAGAGTTTATGAAAA	
4.	GAAGGAAACCACTTTGATAATGGGAACTTACAAAATGTACTTGTAAGAGTTTATGAAAA	
5.	GAAGGAAACCACTTTGATAATGGGAACTTACAAAATGTACTTATAAGAGTTTATGAAAA	
6.	GAAGGAAACCACTTTGATAATGGGAACTTACAAAATGTACTTGTAAGAGTTTATGAAAA	
7.	GAAGGAAACCACTTTGATAATGGGAACTTACAAAATGTACTTGTAAGAGTTTATGAAAA	
8.	GAAGGAAACCACTTTGATAATGGGAACTTACAAAATGTACTTATAAGAGTTTATGAAAA	
414		472
1.	TAAAAGAAACACAATTTCTTTTGAAGTGCAAACCTGATAAGAAAAGTGTAACAGCTCAAG	
2.	TAAAAGAAACACAATTTCTTTTGAAGTGCAAACCTGATAAGAAAAGTGTAACAGCTCAAG	
3.	TAAAAGAAACACAATTTCTTTTGAAGTGCAAACCTGATAAGAAAAGTGTAACAGCTCAAG	
4.	TAAAAGAAACACAATTTCTTTTGAAGTGCAAACCTGATAAGAAAAGTGTAACAGCTCAAG	
5.	TAAAAGAAACACAATTTCTTTTGAAGTGCAAACCTGATAAGAAAAGTGTAACAGCTCAAG	
6.	TAAAAGAAACACAATTTCTTTTGAAGTGCAAACCTGATAAGAAAAGTGTAACAGCTCAAG	
7.	TAAAAGAAACACAATTTCTTTTGAAGTGCAAACCTGATAAGAAAAGTGTAACAGCTCAAG	
8.	TAAAAGAAACACAATTTCTTTTGAAGTACAAACCTGATAAGAAAAGTGTAACAGCTCAAG	
9.	TAAAAGAAACACAATTTCTTTTGAAGTGCAAACCTGATAAGAAAAGTGTAACAGCTCAAG	
473	Primer SEC-F	531
1.	AACTAGACATAAAAGCTAGGAGTTTTTTAATTAATAAAAAAAATTTGTATGAGTTTAAAC	
2.	AACTAGACATAAAAGCTAGGAATTTTTTTAATTAATAAAAAAAATTTGTATGAGTTTAAAC	
3.	AACTAGACATAAAAGCTAGGAATTTTTTTAATTAATAAAAAAAATTTGTATGAGTTTAAAC	
4.	AACTAGACATAAAAGCTAGGAATTTTTTTAATTAATAAAAAAAATTTGTATGAGTTTAAAC	
5.	AACTAGACATAAAAGCTAGGAATTTTTTTAATTAATAAAAAAAATTTGTATGAGTTTAAAC	
6.	AACTAGACATAAAAGCTAGGAATTTTTTTAATTAATAAAAAAAATTTGTATGAGTTTAAAC	
7.	AACTAGACATAAAAGCTAGGAATTTTTTTAATTAATAAAAAAAATTTGTATGAGTTTAAAC	
8.	AACTAGACATAAAAGCTAGGAATTTTTTTAATTAATAAAAAAAATTTGTATGAGTTTAAAC	
9.	AACTAGACATAAAAGCTAGGAATTTTTTTAATTAATAAAAAAAATTTGTATGAGTTTAAAC	

532		590
1.	AGTTCACCATATGAAACAGGATATATAAAATTTATTGAAAATAACGGCAATACTTTTTTG	
1.	AGTTCACCATATGAAACAGGGTATATAAAATTTATTGAAAATAACGGCAATACTTTTTTG	
2.	AGTTCACCATATGAAACAGGATATATAAAATTTATTGAAAAGTAACGACAATACTTTTTTG	
3.	AGTTCACCATATGAAACAGGATATATAAAATTTATTGAAAATAACGGCAATACTTTTTTG	
4.	AGTTCACCATATGAAACAGGATATATAAAATTTATTGAAAATAACGGCAATACTTTTTTG	
5.	AGTTCACCATATGAAACAGGATATATAAAATTTATTGAAAATAACGGCAATACTTTTTTG	
6.	AGTTCACCATATGAAACAGGATATATAAAATTTATTGAAAATAACGGCAATACTTTTTTG	
7.	AGTTCACCATATGAAACAGGATATATAAAATTTATTGAAAATAACGGCAATACTTTTTTG	
8.	AGTTCACCATATGAAACAGGATATATAAAATTTATTGAAAATAACGGCAATACTTTTTTG	
591		649
1.	GTATGATATGATGCCTGCACCAGGAGATAAGTTTGACCAATCTAAATATTTAATGATGT	
2.	GTATGATATGATGCCTGCACCAGGAGATAAGTTTGACCAATCTAAATATTTAATGATGT	
3.	GTATGATATGATGCCTGCACCAGGCGATAAGTTTGACCAATCTAAATATTTAATGATAT	
4.	GTATGATATGATGCCTGCACCAGGCGATAAGTTTGACCAATCTAAATATTTAATGATGT	
5.	GTATGATATGATGCCTGCACCAGGCGATAAGTTTGACCAATCTAAATATTTAATGATGT	
6.	GTATGATATGATGCCTGCACCAGGCGATAAGTTTGACCAATCTAAATATTTAATGATAT	
7.	GTATGATATGATGCCTGCACCAGGCGATAAGTTTGACCAATCTAAATATTTAATGATGT	
8.	GTATGATATGATGCCTGCACCAGGCGATAAGTTTGACCAATCTAAATATTTAATGATGT	
9.	GTATGATATGATGCCTGCACCAGGCGATAAGTTTGACCAATCTAAATATTTAATGATGT	
650		708
1.	ACAACGACAATAAAACGGTTGATTCTAAAAGTGTGAAGATAGAAGTCCACCTTACAACA	
2.	ACAACGACAATAAAACGGTTGATTCTAAAAGTGTGAAGATAGAAGTCCACCTTACAACA	
3.	ACAGCGACAATAAAACGGTTGATTCTAAAAGTGTGAAGATAGAAGTCCACCTTACAACA	
4.	ACAACGACAATAAAACGGTTGATTCTAAAAGTGTGAAGATAGAAGTCCACCTTACAACA	
5.	ACAACGACAATAAAACGGTTGATTCTAAAAGTGTGAAGATAGAAGTCCACCTTACAACA	
6.	ACAAAGACAATAAAATGGTTGATTCTAAAAGTGTGAAGATAGAAGTCCACCTTACAACA	
7.	ACAACGACAATAAAACGGTTGATTCTAAAAGTGTGAAGATAGAAGTCCACCTTACAACA	
8.	ACAACGACAATAAAACGGTTGATTCTAAAAGTGTGAAGATAGAAGTCCACCTTACAACA	
9.	ACAACGACAATAAAACGGTTGATTCTAAAAGAGTGAAGATAGAAGTCCACCTTACAACA	
673	Primer SEC-R	
1.	AAGAATGGATAA-----	<i>sec</i> -ovine (L13379) <sup>1</sup>
2.	AAGAATGGATAA-----	<i>sec</i> -bovine (L13376)
3.	AAGAATGGATAA-----	<i>sec</i> -canine (U91526)
4.	AAGAATGGATAATGTTAATCCGATTT	<i>sec1</i> ( <i>entC1</i> , X05815)
5.	AAGAATGGATA-----	<i>sec2</i> (BOHACH und SCHLIEVERT, 1989)
6.	AAGAATGGATAA-----	<i>sec3</i> (L13377)
7.	AAGAATGGATAA-----	<i>sec4446</i> (L13374)
8.	AAGAATGGATAA-----	<i>sec740N</i> (L13375)
9.	AAGAATGGATAA-----	<i>sec</i> -Copeland (L13378)

-Sequenz in Gendatenbank nicht enthalten

<sup>1</sup>Zugangsnummer der Gendatenbank

Referenzen: *sec*-ovine, *sec*-bovine, *sec3*, *sec4446*, *sec740N*, *sec*-Copeland: MARR et al. (1993)  
*sec*-canine: EDWARDS et al. (1997)  
*entC1*: BOHACH und SCHLIEVERT (1987)  
*sec2*: (Die Sequenz ist nicht in der Datenbank verfügbar und wurde Angaben von  
BOHACH und SCHLIEVERT (1989) entnommen.)

Die Markierungen zeigen die Unterschiede in der Gensequenz

Der Sequenzvergleich erfolgte mit dem Computerprogramm CLUSTAW

(<http://clustaw.genome.ad.jp>)



## Anhang 2

Sequenzvergleich der Nukleotidsequenz des Gens *tst* und *tst*-ovine von *S. aureus* sowie die Ansatzstellen der von JOHNSON et al. (1991) beschriebenen Oligonukleotidprimer

1	60
1. TGAATAAAAAATTACTAATGAATTTTTTATCGTAAGCCCTTTGTTGCTTGCGACAAC	60
2. ATGAATAAAAAATTACTAATGAAATTTTTCATCGTAAGCCCTTTGTTGCTTGCGACAATC	60
61	120
1. CTACAGATTTTACCCCTGTTCCCTTATCATCTAATCAAATAATCAAACTGCAAAAGCAT	120
2. CTACAGGTTTTACCCCTGTTCCCTTATCATCTAATCAAACTGCAAAAGCAAAATAATCT	120
121	180
1. CTACAAACGATAATATAAAGGATTTGCTAGACTGGTATAGTAGTGGGTCTGACACTTTTA	180
2. CTACAAATGATAATATAAAGGATTTGCTAGACTGGTATAGTAGTGGGTCTGACGCTTTTA	180
181	
1. CAAATAGTGAAGTTTTAGATAATTCCTTAGGATCTATGCGTATAAAAAACACAGATGGCA	
2. CAAATAGTGAAGTTTTAGATAATTCCTTAGGATCTATGCGTATAAAAAACACAGATGGCA	
Primer tst1	300
1. GCATCAGCTTGATAATTTTTCCGAGTCCTTATTATAGCCCTGCTTTTACAAAAGGGGAAA	300
2. GCATCAGCTTATAATTTTTCCGAGTCCTTATTATAGCCCTACTTTTCAAAAAGGGGAAA	300
301	360
1. AAGTTGACTTAAACACAAAAAGAACTAAAAAAGCCAACATACTAGCGAAGGAACTTATA	360
2. AAGTTGACTTAAACACAAAAAGAACTAAAAAAGCCAACATACTAGCGAAGGAACTTGGA	360
361	420
1. TCCATTTCCAAATAAGTGGCGTTACAAATACTGAAAAATTACCTACTCCAATAGAACTAC	420
2. TTCATTTCCAAATAAGTGGTGTACAAATACTGAAAAATTACCTACTCCAATAGAACTAC	420
421	480
1. CTTTAAAAGTTAAGGTTTCATGGTAAAGATAGCCCCTTAAAGTATGGGCCAAAGTTCGATA	480
2. CTTTAAAAGTTAAGGTTTCATGGTAAAGATAGCCCCTTAAAGTATTGGGCCAAAGTTCGATA	480
481	540
1. AAAACAATTAGCTATATCAACTTTAGACTTTGAAATTCGTCATCAGCTAACTCAAATAC	540
2. AAAACAATTAGCTATATCAACTTTAGACTTTTAAATTCGTCATCAGCTAACTCAAACAC	540
541	600
1. ATGGATTATATCGTTCAAGCGATAAAACGGGTGGTTATTGGAAAAATAACAATGAATGACG	600
2. ATGGATTATATCGTTCAAGCGATAAAACGGGTGGTTATTGGAAAAATAACAATGAATGACG	600
601	660
1. GATCCACATATCAAAGTGATTTATCTAAAAAGTTTGAATACAATACTGAAAAACCACTA	660
2. GATCCACATATCAAAGTGATTTATCTAAAAAGTTTGAATACAATACTGAAAAACCACTA	660
661	704
1. TAAATATTGATGAAATAAAAACTATAGAAGCAGAAATTAATTAA	704
2. TAAATATTGATGAAATAAAAACTATAGAAGCAGAAATTAATTAA	704
1. <i>tst</i>	(Zugangsnummer der Gendatenbank AB084255, TANEIKE et al., 2002) <sup>1</sup>
2. <i>tst</i> -ovine	(Die Sequenz ist nicht in der Datenbank verfügbar und wurde Angaben von LEE et al.(1992) entnommen.)

Die Markierungen zeigen die Unterschiede in der Gensequenz

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ch. Lämmle für die Überlassung des Themas sowie für seine unermüdliches Interesse und seine Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Ebenso bin ich Herrn Prof. Dr. E. Usleber für seine Geduld und Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung dieser Dissertation zu großem Dank verpflichtet.

Auch möchte ich Herrn Dr. J. Brückler für die abschließende Durchsicht der Arbeit meinen Dank aussprechen.

Für die Bereitstellung der verwendeten Proben danke ich Herrn Dr. M. Zschöck und Frau Dr. B. Kloppert vom Staatlichen Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Mittelhessen, Giessen; Herrn Dr. H. Bocklisch und Frau Dr. S. Schött vom Tiergesundheitsdienst Thüringen, Bad Langensalza; Frau Dr. P. Winter und Frau F. Giffinger von der Medizinischen Universitätsklinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Universität, Wien; sowie Frau Dr. Ch. Dodd von der Division of Food Sciences der University of Nottingham, UK.

Mein Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften die mich im Rahmen dieser Arbeit mit ihrer Hilfsbereitschaft bei allen anfallenden Problemen unterstützt haben, insbesondere Herrn A. A. Hassan, Herrn Ö. Akineden, Herrn K. Cabral, Herrn Ö. Ali Yildirim, Frau K. Merl und Frau Dr. Schneider.

Abschließend möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, sowie meinen Freunden für die unermüdliche Unterstützung und Toleranz während dieser Zeit herzlich danken.